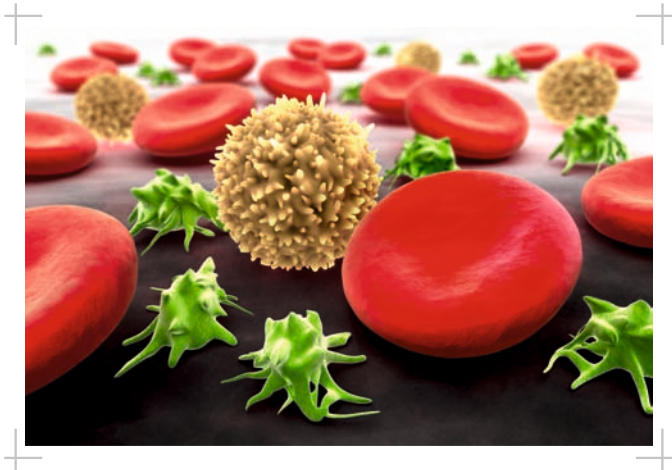


Die Analyse retikulierter Thrombozyten beim Hund mit den Hämatologiegeräten Sysmex XT-2000iV und ADVIA 120/2120

Dana Oellers



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

**Die Analyse retikulierter Thrombozyten beim Hund
mit den Hämatologiegeräten Sysmex XT-2000iV und
ADVIA 120/2120**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dana Oellers
Tierärztin aus Aachen

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz
Prof. Dr. Hermann Willems

Prüfer: Prof. Dr. Martin Diener

Tag der Disputation: 10.02.2015

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
2	Literaturübersicht.....	6
2.1	Thrombopoese	6
2.1.1	Megakaryozyten	6
2.1.2	Proplatelet-Morphogenese.....	10
2.2	Allgemeines zu retikulierten Thrombozyten	14
2.3	Die Messung retikulierter Thrombozyten.....	17
2.4	Retikulierte Thrombozyten, Thrombozytopenie und Thrombozytengröße	22
2.5	Messprinzipien des Sysmex XT-2000iV	28
2.5.1	Impedanzmessung	29
2.5.2	Optische Messung	32
2.6	Messprinzipien des ADVIA 120/2120.....	37
2.6.1	Erythrozyten-/Thrombozyten-Methode	39
2.6.2	Retikulozyten-Methode	41
3	Material und Methoden.....	45
3.1	Tiere.....	45
3.2	Blutentnahme.....	46
3.3	Blutzellzählung.....	46
3.3.1	Sysmex XT-2000iV	46
3.3.2	ADVIA 120/2120	47
3.4	Analyse	48
3.4.1	Sysmex XT-2000iV	48
3.4.2	ADVIA 120/2120	55
3.5	Statistik	57

3.5.1	Präzision	58
3.5.2	Methodenvergleich	58
3.5.3	Referenzintervalle	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Präzision	61
4.1.1	Präzision ADVIA 120/2120	62
4.1.2	Präzision Sysmex XT-2000iV	63
4.2	Methodenvergleich	64
4.2.1	Spearman-Korrelation, Passing-Bablok-Regression und Bland-Altman-Analyse	64
4.2.2	Überprüfung auf signifikante Unterschiede	69
4.2.3	ROC-Kurven	70
4.2.4	Sensitivität und Spezifität.....	73
4.2.5	Interferenzen.....	75
4.3	Der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern.....	75
4.4	Referenzintervalle.....	78
4.4.1	Alle Hunde	79
4.4.2	Beagle.....	81
4.4.3	Hunde verschiedener Rassen.....	83
5	Diskussion.....	87
5.1	Präzision	87
5.2	Methodenvergleich	90
5.2.1	Die Messung retikulierter Thrombozyten mit verschiedenen Gates beim Sysmex XT-2000iV.....	90
5.2.2	Die Messung retikulierter Thrombozyten mit dem ADVIA 120/2120.....	96
5.3	Retikulierte Thrombozyten und Thrombozytenindizes	101
5.4	Absolute oder relative r-PLT-Werte	107

5.5	Referenzwerte	111
5.5.1	Referenzwerte der Messung retikulierter Thrombozyten.....	111
5.5.2	Referenzwerte der Thrombozytenparameter des ADVIA 120/2120	113
5.5.3	Referenzwerte der Thrombozytenparameter des Sysmex XT-2000iV	115
6	Zusammenfassung.....	117
7	Summary	120
8	Literaturverzeichnis	122
9	Abkürzungen.....	131
10	Danksagung.....	136

1 Einleitung

Juvenile Thrombozyten sind frisch aus dem Knochenmark entlassene Thrombozyten und stellen das Pendant zu den Retikulozyten der Erythrozyten dar. Sie werden analog zu diesen auch als retikulierte Thrombozyten (r-PLT = reticulated platelets) bezeichnet. Somit liefern sie eine Messgröße zur Beurteilung der Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks bei einem erhöhten Thrombozyten-Turnover bzw. bei Thrombozytopenie. War man früher auf die Knochenmarksuntersuchung als alleiniges diagnostisches Mittel zur Einteilung der Thrombopenieform (in nicht-regenerativ und regenerativ) angewiesen, bietet die Bestimmung des Anteils der retikulierten Thrombozyten im Blut nun eine weniger aufwändige Methode. Die hierfür benötigte Blutprobe ist deutlich weniger invasiv zu gewinnen als ein Knochenmarkspunktat und daher auch für eine engmaschige Patientenkontrolle gut geeignet. Wünschenswert ist die Analyse der r-PLT im Rahmen automatisierter speziesspezifischer Blutuntersuchungen. Durch die dann identische Probenbearbeitung und –auswertung sind die Ergebnisse vergleichbar und die Zahlen objektiv beurteilbar.

Entdeckt wurden retikulierte Thrombozyten beim Hund 1969 von Ingram und Coopersmith. Nach einem iatrogen verursachten Blutverlust bei Beagles waren sie vermehrt auf Blutaussstrichen zu sehen, die mit Neumethylenblau gefärbt waren (Ingram und Coopersmith, 1969). Dieses Verfahren wurde abgelöst von der durchflusszytometrischen Bestimmung der mit dem Cyanin-Farbstoff Thiazol Orange behandelten Zellen. Eingesetzt wird diese Methode beim Menschen und verschiedenen Tierarten wie dem Hund, dem Pferd und der Ratte (Michur et al., 2008; Monteagudo et al., 2008; Nakamura et al., 2002; Salvagno et al., 2006; Pankraz et al., 2009; Russell et al., 1997; Pankraz et al., 2008). Da die klassische Durchflusszytometrie für den Einsatz in Praxen und Kliniken zu zeitintensiv und teuer und dadurch nicht praktikabel ist, setzt sich die Bestimmung der retikulierten Thrombozyten mithilfe von automatischen Hämatologiegeräten immer mehr durch. Ihr Einsatz wurde in der Humanmedizin bei unterschiedlichen Erkrankungen und Patienten vielfach demonstriert (Briggs et al., 2004; Cesari et al., 2013; De Blasi et al., 2012; Di Mario et al., 2009; Saigo et al., 2008; Zucker et al., 2006). Wie in der Humanmedizin ist ebenfalls in der Veterinärmedizin bei der quantitativen Bestimmung der juvenilen Thrombozyten das automatisierte Hämatologiesystem XT-2000iV¹ der Fa. Sysmex (Kobe, Japan) herauszustellen. Unsere Arbeitsgruppe mit Dr. Alexander

Pankraz etablierte 2009 die Methode der r-PLT-Messung am Sysmex XT-2000iV¹ (Pankraz et al., 2009). Somit steht in der Tierhämatologie nun ein einfaches und automatisiertes Verfahren zur Beurteilung der Thrombozytenregeneration mittels Vollblut zur Verfügung.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der bereits in der Literatur für den Sysmex XT-2000iV publizierten r-PLT-Gates sowie die Neuentwicklung der r-PLT-Messung mithilfe des ADVIA 120/2120. Darüber hinaus wird der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und den Thrombozytenindizes untersucht. Für alle untersuchten Parameter werden Referenzwerte erstellt.

¹ Alle in dieser Arbeit genannten Unternehmens-, Produkt- oder Markenbezeichnungen können durch Markenrecht oder andere Schutznormen geschützt sein. Die Verwendung erfolgt rein informativ und deskriptiv. Sie berechtigt nicht zur Annahme, die Marke sei frei verfügbar.

2 Literaturübersicht

2.1 Thrombopoese

Thrombozyten werden von Megakaryozyten gebildet, die sich bei Menschen und Haustieren primär im Knochenmark befinden (Weiss und Wardrop, 2010b). Die Megakaryozyten selbst entstehen hier aus pluripotenten Stammzellen. Sie produzieren einzig und allein Thrombozyten, dies jedoch in sehr großer Zahl. Dabei entwickeln sich die Megakaryozyten durch den einzigartigen Prozess der Endomitose zu polyploiden Zellen und gehen anschließend in eine zügige zytoplasmatische Expansionsphase über. Hierbei bilden sie das demarkierende Membransystem (DMS), zahlreiche Granula und Proteine, die für den Bau der Thrombozyten notwendig sind. Mithilfe ihres Zytoskeletts strukturieren die Megakaryozyten anschließend ihren Zellkörper um und bilden perlschnurartige Ausläufer, die sogenannten Proplatelets, aus denen letztendlich Thrombozyten entstehen (Michelson, 2012).

2.1.1 Megakaryozyten

Wie alle Zellen des Blutes stammen Megakaryozyten von pluripotenten Stammzellen ab, die sich in alle hämatopoetischen Zelllinien differenzieren können. Sie sorgen so für die Neubildung von Erythrozyten, Thrombozyten, Osteoklasten und mehr als acht verschiedenen leukozytären Linien. Hierbei werden sie stark von ihrer zellulären Umgebung, der Stammzellnische, bestimmt. Diese besteht unter anderem aus Stroma- und Endothelzellen, Osteoblasten und Adipozyten (Rieger und Schroeder, 2007). Die pluripotente Stammzelle entwickelt sich wahrscheinlich zu einer bipotentiellen Vorläufer-Zwischenzelle und bildet biklonale Kolonien. Diese sind zusammengesetzt aus megakaryozytären und erythroiden Zellen. Daraus entwickelt sich nun die determinierte oder unipotente Vorläuferzelle (Michelson, 2012).

Die diploiden Vorläufer-Zwischenzellen, die zu der megakaryozytären Linie gehören, werden basierend auf ihrer funktionellen Eigenschaft in zwei Kategorien eingeteilt. Zum einen gibt es mit der „megakaryocyte burst-forming cell“ eine primitive Vorläuferzelle, die sich aus einer

gemischten Linie bipotentieller erythroider und megakaryozytärer Zellen entwickelt. Von der Morphologie ähnelt sie eher einem kleinen Lymphozyten als einem reifen Megakaryozyten. Sie besitzt eine hohe Proliferationskapazität und bildet große Megakaryozyten-Kolonien. Unter entsprechenden Kulturbedingungen kann eine „megakaryocytic burst-forming cell“ innerhalb einer Woche 40 bis 500 Megakaryozyten hervorbringen (Michelson, 2012).

Die zweite Kategorie beinhaltet die „colony-forming cell“. Hierbei handelt es sich um einen reiferen Megakaryozyten-Vorläufer, welcher eine Kolonie von 30 bis 50 reifen Megakaryozyten bildet, die in ihrem Proliferationspotential variieren (Michelson, 2012).

Den nächsten Entwicklungsschritt bildet der Promegakaryoblast, der erste morphologisch erkennbare Megakaryozytenvorläufer im Knochenmark, mit einem Durchmesser von 10 µm. Darauf folgen der Megakaryoblast, der Promegakaryozyt und schließlich der Megakaryozyt. Eine andere Bezeichnung für den Megakaryoblast ist Stufe I Megakaryozyt. Er ist eine 15 – 50 µm große, reifere Zelle mit einem nierenförmigen Nukleus, der einen verdoppelten Chromosomensatz enthält (4N) und einen Großteil der Zelle ausmacht. Er besitzt viele Ribosomen, während es ihm zu diesem Zeitpunkt noch an Granula fehlt. Weiterhin ist er durch die blasenbildende Zytoplasmamembran ausgezeichnet und Acetylcholinesterase-positiv. Der 20 bis 80 µm große Promegakaryozyt oder Stufe II Megakaryozyt enthält nun Granula. Sein Plasma ist weniger basophil (Michelson, 2012). Während dieser Entwicklung wandert der Megakaryozyt in Richtung der venösen Sinus. Zudem werden die Vorstufen des Megakaryozyten immer größer bis der Megakaryozyt mit bis zu 150 µm schließlich die größte Zelle des Knochenmarks darstellt. Es vergehen vier bis fünf Tage von der Entwicklung des Megakaryozyten bis zur Freisetzung neuer Thrombozyten (Weiss und Wardrop, 2010a).

Alle Stadien der Megakaryozyten-Entwicklung werden von Thrombopoetin beeinflusst. Hauptsächlich wird es in der Leber gebildet, aber auch in der Niere und den Stromazellen des Knochenmarks wird es produziert (Weiss und Wardrop, 2010b). Das Hormon ist der hauptsächliche Regulator der Thrombopoese. Das Thrombopoetin–Thrombopoetinrezeptor-System ist insgesamt verantwortlich für den Erhalt der Thrombozytenmasse. Die Thrombopoetinrezeptoren der Thrombozyten binden Thrombopoetin mit hoher Affinität, woraufhin es internalisiert und abgebaut wird. Bei Thrombozytopenie ist vermehrt freies Thrombopoetin im Blut vorhanden, das die Thrombopoese stimuliert (Weiss und Wardrop, 2010a). Vor der Polyploidie werden die frühen Stadien der Megakaryozyten-Entwicklung zusätzlich von IL-3 (Interleukin 3) gesteuert. Zudem spielen IL-6, IL-11 und SCF (stem cell factor) eine Rolle. Sie wirken jedoch nur in Verbindung mit Thrombopoetin und IL-3

(Michelson, 2012). Weitere Faktoren bei der Thrombopoese sind IL-1, IL-12, GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor), Erythropoetin und der leukemia inhibitory factor (Weiss und Wardrop, 2010a).

Der Megakaryozyt zeichnet sich durch seine Polyploidie aus, auf die er bei der Thrombozytenbildung angewiesen ist. Hierbei kommt es zu DNA (desoxyribonucleic acid)-Replikationen, ohne dass sich die Zelle teilt. Es sind zwei bis sechs Zyklen der Replikation möglich. Meist werden jedoch beim Menschen drei Replikationsvorgänge durchlaufen (Michelson, 2012). Beim Hund sind es in der Regel vier Durchgänge, was zu einem 32-fachen Chromosomensatz führt. Die Polyploidie des Megakaryozyten korreliert mit der Anzahl an Thrombozyten, die er später produzieren wird (Weiss und Wardrop, 2010b). Der Endomitose fehlt nicht die komplette Mitose. Diese wird vielmehr frühzeitig beendet und es kommt zu einem Stillstand vor der Anaphase B. Während der Polyploidisierung bricht die Kernhülle auf und es bildet sich eine veränderte mitotische Spindel mit zahlreichen Polen. Hierbei findet keine vollständige Trennung der Tochterchromosomen statt (Michelson, 2012).

Nach Abschluss der Endomitose beginnt die zytoplasmatische Reifung des Megakaryozyten. Hierbei füllt sich das Zytoplasma mit für Thrombozyten spezifischen Proteinen, Organellen und Membran-Systemen, die für die Thrombozytenbildung benötigt werden. Elektronenmikroskopisch lassen sich jetzt ausgeprägte Strukturen erkennen. Dazu gehören das demarkierende Membransystem, das dichte tubuläre System und die Granulabildung (Michelson, 2012).

Das DMS der Megakaryozyten ist ein Netzwerk von Membrankanälen aus abgeflachten Zisternen und Tubuli. Es kommt schon in Promegakaryozyten vor, ist aber am offensichtlichsten in reifen Megakaryozyten. Bei diesen durchsetzt es das Zytoplasma mit Ausnahme des äußeren kortikalen Zytoplasmas. Das DMS soll sich von Invaginationen der Megakaryozytenplasmamembran ableiten und steht in Kontakt mit dem extrazellulären Milieu. Seine ursprünglich angenommene Funktion war das Vorformen von „platelet territories“ innerhalb des Megakaryozytenplasmas. Aktuell geht man davon aus, dass es eine Membran-Reserve für Thrombozytenausbildung und -erweiterung darstellt (Michelson, 2012).

Es wird angenommen, dass das dichte Tubulussystem der Ort der Prostaglandinsynthese in Thrombozyten ist. Es scheint im Gegensatz zum DMS nicht in Kontakt mit der äußeren Umgebung zu stehen.

Die Bildung der Granula charakterisiert die Megakaryozytenreifung. Die α -Granula kommen hierbei am häufigsten vor. Sie enthalten Proteine, die für die Adhäsion der Thrombozyten während der Gefäßreparatur essenziell sind. Ihr Durchmesser beträgt 200 bis 500 nm. Sie sind von kugelförmiger Form mit einem zentralen dunklen Innenteil und entspringen dem Trans-Golgi-Apparat. α -Granula enthalten endogen vom Golgi-Apparat synthetisierte Stoffe wie den Plateletfaktor 4, β -Thromboglobulin und den Von-Willebrand-Faktor. Diese sind in den Megakaryozyten enthalten, bevor Endozytoseproteine wie Fibrinogen aufgenommen werden. Zusätzlich sind Integrin $\alpha 2\beta 3$, P-Selektin (CD62P) und CD36 enthalten (Michelson, 2012). Ein Zwischenprodukt oder Sortierkompartiment bei der Reifung von α -Granula und dichten Granula scheinen die „multivesicular bodies“ zu sein. Sie enthalten den Von-Willebrand-Faktor, β -Thromboglobulin, P-Selektin und CD63. Diese Granula beinhalten zunächst 30 bis 70 nm große Vesikel und entwickeln sich dann zu Granula mit überwiegend dichtem Material. Dichte Granula sind ungefähr 250 nm groß und weisen einen elektronenmikroskopisch sichtbaren elektronendichten Innenteil auf. Zudem beinhalten sie hämostatisch aktive Substanzen wie Serotonin, Katecholamine, ADP (Adenosindiphosphat), ATP (Adenosintriphosphat) und Calcium (Michelson, 2012).

Zur Thrombozytenbildung existieren verschiedene Modelle, die mittels Thrombopoetin erforscht werden. Dieses Zytokin bindet an den megakaryozytenspezifischen Rezeptor c-MPL und begünstigt Wachstum und Entwicklung der Megakaryozytenausläufer. Die Theorie der Thrombozyten-Knospe als Ursprung der Thrombozyten ist mittlerweile widerlegt, da die beobachteten Knospen keinerlei Organellen enthalten und eventuell mit der Pseudopodienbildung der Megakaryozyten, die für die anfängliche Phase der Proplatelet-Bildung typisch ist, verwechselt wurden (Michelson, 2012).

Die zweite These ist die der Thrombozytenbildung mittels zytoplasmatischer Fragmentation durch das demarkierende Membransystem. Hierbei sollen sich zwischen den entstehenden Feldern DMS-Zerfallslinien bilden. Aus den so abgetrennten Territorien sollen sich die Thrombozyten entwickeln. Für diese Theorie gibt es einige Gegenargumente wie die fehlende strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Feldern und Thrombozyten. Diese besitzen beispielsweise keine marginalen Mikrotubuli-Bündel, die für Thrombozyten allerdings typisch sind (Michelson, 2012).

Ein anderes Modell beschreibt die Thrombopoese über den Zwischenschritt der Proplatelets. Proplatelets sind lange (bis zu Millimeter lange) dünne zytoplasmatische Ausläufer, die von Megakaryozyten ausstrahlen. Charakterisiert sind sie durch multiple thrombozytengroße

Schwellungen, welche durch dünne Zytoplasmabrücken verbunden sind. Man geht davon aus, dass es sich hierbei um intermediäre Strukturen beim Übergang vom Megakaryozytenbestandteil zum Thrombozyten handelt. Aktuelle Beweise unterstützen ein modifiziertes Proplatelet-Modell. Zum einen ergibt die Reifung von Proplatelets Thrombozyten, die strukturell und funktionell den Thrombozyten des Blutes ähnlich sind. Außerdem entwickeln Megakaryozyten Ausläufer, die in die Sinus des Knochenmarks ziehen, und darüber Proplatelets in den Kreislauf entlassen. Man geht davon aus, dass sie hier weiter in einzelne Thrombozyten fragmentiert werden. Einen Beweis liefern Versuche an bestimmten Knock-out-Mäusen, denen zwei hämatopoetische Transkriptionsfaktoren fehlen. Infolgedessen können ihre Megakaryozyten in Kultur keine Proplatelets ausbilden. Die Mäuse zeigen eine schwere Thrombozytopenie (Michelson, 2012).

2.1.2 Proplatelet-Morphogenese

Erforscht wurde die Thrombozyten-Morphogenese zunächst an Megakaryozyten in Kultur. Hier wurde beobachtet, dass die Megakaryozyten Ausläufer entwickeln, in die für Thrombozyten typische Organellen und Granula transportiert werden. Die Umstrukturierung des Plasmas dauert vier bis zehn Stunden. Die zunächst dicken Ausläufer beugen und verzweigen sich, reduzieren ihren Durchmesser auf zwei bis vier μm und verlängern sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,85 $\mu\text{m}/\text{Minute}$. Sie entwickeln sich zu perlschnurartigen Proplatelets, bestehend aus thrombozytengroßen Verdickungen, die nun lediglich über dünne Zytoplasmabrücken miteinander verbunden sind. Die beschriebene Proplatelet-Bildung beginnt an einem Pol des Megakaryozyten mit einer Auffädung des Plasmas und wird als Erosion beschrieben. Der Prozess schreitet so lange fort, bis der nackte Kern des Megakaryozyten von lauter aus Proplatelets bestehenden Verzweigungen umgeben ist (Michelson, 2012). Schließlich zieht sich der residuale Megakaryozyt rasch zurück, entlässt die Proplatelets und geht selbst in Apoptose über (Weiss und Wardrop, 2010b). Durch Ruptur der Zytoplasmabrücken zwischen den thrombozytengroßen Verdickungen der Proplatelets gelangen einzelne Thrombozyten in den Blutkreislauf (Michelson, 2012).

Das Zytoskelett des reifen Thrombozyten ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der diskoiden Form des ruhenden Thrombozyten und für die Formänderung bei Aktivierung.

Dieselben Zytoskelettproteine ermöglichen die Formänderung während der Megakaryozytenreifung. Eine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenbildung spielen Aktin und Tubulin. Beim jungen Megakaryozyten, der noch keine Proplatelets bildet, sind die Mikrotubuli in der Zellmitte angeordnet und schrauben sich von hier nach außen. Beginnt nun die Proplatelet-Bildung werden vermehrt Mikrotubuli zusammengebaut und verdichten sich in der kortikalen Zone. Beginnen die Proplatelets mit der Verlängerung, ziehen auch die Mikrotubuli in sie hinein. Zur Spitze hin wird das Mikrotubuligerüst dabei immer schlanker. Die Mikrotubuli besitzen ein Minus- und ein Plus-Ende und verlängern sich zu beiden Seiten hin. An der Spitze der Ausläufer biegen sie sich um und formen nur hier eine Schlingen- oder Tränenform. Somit existiert die für Thrombozyten typische kortikale Mikrotubuli-Anordnung nur in jenen Proplatelets, die sich an den Spitzen der Ausläufer befinden. Und nur hier werden reife Thrombozyten gebildet. Für diese Bildung ist auch das Verzweigen und Beugen der Proplatelets nötig, welches wiederum von Aktin abhängig ist. Zusätzlich scheint hier auch der molekulare Motor Myosin eine Rolle zu spielen. Eine Mutation im nichtmuskulären Myosin führt zum Beispiel bei der May-Hegglin-Anomalie des Menschen zu einer Thrombozytopenie in Kombination mit riesigen Thrombozyten. Ebenso hängt die Proplateletbildung von Dynein ab, was das Gleiten der Mikrotubuli ermöglicht und eine Schlüsselrolle bei der Proplatelet-Verlängerung zu spielen scheint. Auch gibt es Anzeichen, dass Spektrin neben der Bildung des demarkierenden Membransystems wichtig für die Erhaltung der Proplatelet-Struktur ist (Michelson, 2012).

Außer der beschriebenen Verlängerung ermöglichen Mikrotubuli ebenfalls den Transport von Organellen, Membranen und Granula bei der Transformation des Megakaryozytenplasmas. Zum einen scheint Kinesin die Organellen entlang der Mikrotubuli zu bewegen. Zum anderen gleiten die Mikrotubuli bidirektional aneinander vorbei und sorgen so für einen indirekten Transport. Erreichen die Organellen und Granula die Spitze der Ausläufer, werden sie hier eingefangen und in die sich bildenden Thrombozyten verpackt (Michelson, 2012). Zusätzlich gelangen die für die Proteinsynthese nötigen Spleißosome und pre-mRNAs (precursor-messenger-ribonucleic acid) in diese Pakete (Weiss und Wardrop, 2010b).

In vivo wandert der Megakaryozyt während seiner Reifung in Richtung der venösen Sinus. Schließlich befindet er sich im extravaskulären Raum auf der abluminalen Seite der Sinusendothelzellen (Weiss und Wardrop, 2010b). Mittels zusätzlicher organellenfreier Ausläufer ist er im Endothel verankert und entlässt die beschriebenen perlschnurförmigen Proplateletverlängerungen in das Lumen der Sinusoide. So gelangen die Proplatelets in die Blutbahn (Michelson, 2012).

Bei kultivierten Mausmegakaryozyten werden die Proplatelets beim Rückzug des verbliebenen Megakaryozyten in Ketten entlassen. Diese Ketten bestehen aus aneinandergereihten thrombozytengroßen Partikeln. Die Mikrotubuli ziehen in dicken linearen Reihen über die Länge dieses Proplateletausläufers entlang bis hin zur Spitze. An diesem Ende eines jeden Proplatelets vollzieht sich die Reifung, bei der sich die Mikrotubuli des Schaftes in den sich gerade ablösenden thrombozytenähnlichen Partikeln zu Ringen organisieren. Diese ringförmige Anordnung ähnelt denen der Thrombozyten im Blutkreislauf. In Kultur bleiben jedoch viele Proplatelets über Zytoplasmafäden miteinander verbunden oder es bilden sich hantelförmige Paarstrukturen (Michelson, 2012).

Die Entlassung der Megakaryozytenfragmente wurde bereits intravital mittels Fluoreszenz-Mikroskopie dargestellt (Junt et al., 2007). Hier wurde jedoch beobachtet, dass die entlassenen Fragmente größer als Thrombozyten sind. Daher wird vermutet, dass sich ihre Entwicklung in der Blutbahn fortsetzt (Michelson, 2012).

Hinsichtlich der Theorie, dass Thrombopoese zumindest teilweise oder final im Blut abläuft, gibt es verschiedene Überlegungen. Megakaryozyten entstehen, wie oben beschrieben, im Knochenmark. Da sie dieses verlassen können, könnte eine Thrombozytenbildung auch außerhalb des Knochenmarks ablaufen. Studien der Thrombopoese wurden zudem in Lunge und Blut gefunden. Auch in vitro bilden Megakaryozyten Proplatelets aus. Die Bildung von Thrombozyten in Kultur scheint jedoch hinsichtlich ihrer Effizienz nicht an die im Knochenmark heranzureichen. Von daher ist davon auszugehen, dass sie durch die Zell-Zell-Kontakte, die endothelialen zellspezifischen Adhäsionsmoleküle und Zytokine des Knochenmarks beeinflusst wird. Es existiert jedoch die Theorie, dass die letzten Stufen der Thrombopoese ausschließlich im Blutstrom ablaufen. Dafür spricht das Vorkommen von Megakaryozyten und ihren Ausläufern im Blut. Diese Fragmente können im Blutplasma 5 bis 20 % der Thrombozytenmasse ausmachen. Werden die Fragmente isoliert, so verlängern sie sich, zeigen dabei das für die Thrombopoese typische Krümmen und teilen sich schließlich. Es entstehen diskoidale Strukturen, die Thrombozytenketten ähneln. Läuft die Thrombopoese in vitro ab, bleiben viele der thrombozytengroßen Partikel über Zytoplasmabrücken verbunden. Es wird vermutet, dass die Scherkräfte im Blut oder ein hier vorliegender unentdeckter Teilungsfaktor für die Trennung der Proplatelets in einzelne Thrombozyten notwendig sind (Michelson, 2012).

Für die These der Thrombozytenbildung in der Lunge sprechen Funde von sich in den Lungengefäßen befindenden Megakaryozyten. Außerdem verringert sich die Zahl der

Megakaryozyten nach Lungenpassage, während die Thrombozytenzahl steigt. Darüber hinaus könnten die Scherkräfte in den Lungenkapillaren zu dem oben erwähnten Zerreißen der Plasmabrücken zwischen den thrombozytengroßen Partikeln führen. Die Theorie der Thrombopoese in der Lunge bleibt jedoch aktuell noch ungeklärt (Michelson, 2012).

Passend zur Theorie der im Blutkreislauf fortgesetzten Thrombopoese wurden in humanem und murinem Blut thrombozytenähnliche Strukturen gefunden, aus denen durch Formveränderung jeweils mindestens zwei Thrombozyten entstehen (Schwertz et al., 2010; Thon et al., 2010; Thon et al., 2012). Während Schwertz et al. sich in ihrer Arbeit nicht festlegen, ob diese Objekte eine Zwischenstufe zwischen den von Megakaryozyten entlassenen Proplatelets und den vollständig entwickelten Thrombozyten darstellen, stufen Thon et al. sie als eine solche Zwischenstufe ein. Sie isolierten sogenannte zirkuläre Preplatelets und hantelförmige Proplatelets aus Megakaryozytenkulturen (Thon et al., 2010). Diese beiden Thrombozytenvorläufer, Preplatelets und hantelförmige Proplatelets, entstehen laut Thon et al. durch die Teilung der langen, von Megakaryozyten entlassenen Proplatelets. Preplatelets sind anukleäre diskoide Strukturen mit einem Durchmesser von 3 – 10 μm (Thon et al., 2012). Sie weisen dicke randständige Mikrotubuli-Bündel auf und besitzen die Fähigkeit, sich reversibel zu hantelförmigen Proplatelets umzuformen (Thon et al., 2010). Zu dieser Umformung sind lediglich Preplatelets von einer Größe zwischen 3 – 10 μm im Stande. Durch das Zusammenspiel von peripheren Mikrotubuli-Bündeln und dem Druck der außenliegenden Aktin-Myosin-Spektrin-Rinde wird die strukturelle Veränderung möglich (Thon et al., 2012). Hierbei bildet sich aus der zirkulären Struktur ein längliches Gebilde. Die mittig gelegenen Mikrotubuli drehen sich nun um sich selbst und verbinden sich an ihrem Drehpunkt. So bildet sich eine dünne Zytoplasmabrücke mit einer zentralen Einschnürung zwischen zwei tränenförmigen thrombozytengroßen Mikrotubulischlingen. Letztendlich ergeben sich hierbei zwei in Hantelform miteinander verbundene Zellkörper, wodurch sich der englische Name „barbell proplatelet“ erklärt. Wird jedoch in Versuchen der Mikrotubulibau verhindert, wird auch die Entwicklung vom Preplatelet hin zu hantelförmigen Proplatelets gestoppt, was die entscheidende Rolle der Mikrotubuli bei diesem Prozess zeigt. Beide Pole der hantelförmigen Proplatelets enthalten Organellen wie dichte Granula und α -Granula, die zudem zwischen den beiden Polen umher wandern. Abschließend spaltet sich die Zytoplasmabrücke an ihrer zentralen Mikrotubuliwindung. Ihre Enden schnellen zu dem jeweiligen Tochterfragment zurück und es werden zwei einzelne Strukturen frei (Thon et al., 2010). Die entstehenden Objekte sind strukturell nicht von Thrombozyten zu unterscheiden und zudem funktionsfähig (Schwertz et al., 2010). In humanem Blut wurde ein Anteil von 3,63 % der zirkulären

Preplatelets an der gesamten Thrombozytenpopulation mittels eines Laser-Scan-Zytometrie-Assays gemessen. Der Anteil der hantelförmigen Proplatelets an der Thrombozytenpopulation betrug 0,05 % (Thon et al., 2012). In vitro wurde von Schwertz et al. nach sechsständiger Kultur eine relative Zahl von ca. 5 % an Zellen mit thrombozytenähnlichen Ausläufern gefunden (Schwertz et al., 2010). Der im Vergleich sehr viel niedrigere Anteil der hantelförmigen Proplatelets in vivo lässt sich anhand der im Blutstrom wirkenden Scherkräfte erklären. Unter dem Einfluss von Scherkräften verschiebt sich rasch das Verhältnis von Proplatelets hin zu Thrombozyten, was für einen beschleunigten Zerfall der Proplatelets in Thrombozyten spricht (Thon et al., 2010). Es liegt der Schluss nahe, dass in vivo hantelförmige Proplatelets rasch nach ihrer Entstehung aus Preplatelets in einzelne Thrombozyten getrennt werden.

2.2 Allgemeines zu retikulierten Thrombozyten

Retikulierte oder auch juvenile Thrombozyten sind das Pendant zu den Retikulozyten der Erythrozyten und stellen die frisch aus dem Knochenmark entlassene Population der Thrombozyten dar. Sie sollen eine Messgröße zur Beurteilung der Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks bei einer Thrombopenie liefern.

Diese These wird durch die Beobachtungen von Kienast et al. bekräftigt. Sie zeigten beim Menschen, dass der prozentuale Anteil der retikulierten Thrombozyten im Blut mit der Anzahl an Megakaryozyten im Knochenmark korreliert. Thrombozytopenische Patienten, deren Megakaryozytenzahl normal bis erhöht war, wiesen hier auch erhöhte prozentuale r-PLT-Zahlen auf. Die Thrombozytenpopulation der Patienten, deren Knochenmark reduziert Megakaryozyten enthielt, besaß entsprechend keinen erhöhten r-PLT-Anteil. Es fällt jedoch auf, dass bei Patienten mit erhöhten Megakaryozytenzahlen sowie erhöhten prozentualen r-PLT-Zahlen die absoluten r-PLT-Zahlen im Mittel trotzdem etwas erniedrigt waren (Kienast und Schmitz, 1990). Dieses Phänomen kann damit erklärt werden, dass bei einem erhöhten Verbrauch an Thrombozyten die gesamte Population vermindert wird und somit auch die jungen Thrombozyten betroffen sind. Demzufolge sinkt auch deren absolute Anzahl. Dies kann bei sehr niedrigen r-PLT-Zahlen der Fall sein. Hierbei weist eine geringe absolute r-PLT-Zahl nicht zwingend auf eine verminderte Thrombopoese hin, da die retikulierten Thrombozyten möglicherweise nicht lange genug leben, um nachgewiesen zu werden (Ault et al., 1992).

Betrachtet man die Thrombozytenzahl und den prozentualen r-PLT-Gehalt im Zusammenhang, so fällt auf, dass sich die Zahlen von adulten und retikulierten Thrombozyten zueinander gegenläufig verhalten (Ault et al., 1992; Briggs et al., 2004). Dies trifft beim Hund ebenfalls zu (Pankraz et al., 2009). Hanahachi et al. fordern sogar, beim Hund diese beiden Werte im Zusammenhang zu interpretieren, da sie stets gegenläufig sein sollten (Hanahachi et al., 2001). Bei Blutbildern von Hunden, wie auch bei denen von Mensch und Maus konnte beobachtet werden, dass ein Anstieg der Fraktion der retikulierten Thrombozyten einer Zunahme der Thrombozytenzahl voraus geht (Ault et al., 1992; Briggs et al., 2004; Kickler et al., 2006; Zucker et al., 2006; Pankraz et al., 2009). Während dann die Thrombozytenzahl zunimmt, fällt zeitgleich der prozentuale r-PLT-Wert wieder ab (Pankraz et al., 2009). Dies scheint der Fall zu sein, wenn die ehemals jungen Thrombozyten nun zu den adulten Zellen gezählt werden. Für den Hund wurde in der Tat ebenfalls gezeigt, dass die mithilfe von Thiazol Orange gefärbten und mittels Durchflusszytometrie bestimmten retikulierten Thrombozyten unter 24 Stunden alt sind und nach dieser Zeit anscheinend in den Pool der adulten Thrombozyten übergehen. Dazu wurde in der betreffenden Studie die sich aktuell im Blut befindende Thrombozyten-Population eines Hundes in vivo mittels Biotin markiert. Eine darauf folgende durchflusszytometrische Auswertung der Blutprobe mit Thiazol Orange zeigte die darin enthaltene Population der juvenilen Thrombozyten. Innerhalb von 24 Stunden verschwand die Population der mit Thiazol Orange und Biotin markierten Zellen und wurde durch eine neue r-PLT-Population ersetzt, die zwar Thiazol-Orange-positiv, aber nun nicht biotinmarkiert und somit neu gebildet war (Dale et al., 1995).

Ein weiterer deutlicher Hinweis für die Aussagekraft der r-PLT-Messung sind die Beobachtungen bei der Gabe von MGDF (megakaryocyte growth and development factor). Humanen Patienten wurde MGDF, eine rekombinante Form von Thrombopoetin, verabreicht (O'Malley et al., 1996). Der Einfluss von Thrombopoetin auf die Megakaryozyten ist bereits bekannt (Michelson, 2012). Nach dreitägiger Behandlung mit MGDF war bei den Behandelten eine deutliche Erhöhung der retikulierten Thrombozyten festzustellen. Dieser Erhöhung wiederum folgte der schon beschriebene Anstieg der Thrombozytenzahl (O'Malley et al., 1996). Auch Zucker et al. beschrieben die Korrelation der Thrombopoetinwerte mit der IPF (immature platelet fraction) (Zucker et al., 2006).

Die frisch ins Blut entlassene Generation der Thrombozyten ist zudem aktiver, verglichen mit den älteren Thrombozyten des Blutes. Nach Aktivierung mit Thrombin zeigen die jüngeren, neu gebildeten Thrombozyten des Hundes im Vergleich eine auffallend gesteigerte Aktivität (Peng et al., 1994). Ihre Biosynthese ist gegenüber adulten Thrombozyten sogar zehnfach erhöht, wie

für den Menschen demonstriert wurde (Kieffer et al., 1987). Diese beiden Punkte, Aktivierung und Biosynthese, stehen in einem engen Zusammenhang miteinander. Zwar enthalten Thrombozyten keinen Zellkern, doch scheinen sie durchaus zur Proteinsynthese befähigt zu sein. Bei vergleichender Untersuchung ihres Transkriptoms und ihrer Proteine, wurde für 69 % der Sekretionsproteine die übereinstimmende mRNA gefunden (McRedmond et al., 2004). Diese RNA (ribonucleic acid) ist unabhängig von der Aktivität der Thrombozyten, das heißt, sie ist bei aktivierten und ruhenden Zellen identisch. Die aktivierten Blutplättchen bilden mittels der mRNA jedoch Proteine (Lindemann et al., 2001). Diese Translation konnte in Versuchen durch Thrombin induziert werden. Die so aktivierten Thrombozyten synthetisierten Bcl-3, ein Mitglied der I κ B- α -Familie der regulatorischen Proteine (Weyrich et al., 1998). Der Vorgang der Translation von Bcl-3 in den Thrombin-aktivierten Thrombozyten ist von dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ abhängig (Pabla et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass speziell markierte Aminosäuren zusätzlich in andere Proteine eingebaut wurden, was einen weiteren Beleg für die Proteinbiosynthese in Thrombozyten darstellt (Weyrich et al., 1998). In einer anderen Studie wurden Blutplättchen mithilfe von Thrombin, ADP, Kollagen oder Epinephrin aktiviert, woraufhin sie ebenfalls mit Translation reagierten und deutlich mehr IL-1 β bildeten (Lindemann et al., 2001).

Ein weiterer Unterschied zwischen jungen und alten Thrombozyten ist der den ersteren eigene Schutz vor Apoptose. Die genetische Programmierung der Thrombozyten beinhaltet ihr Sterben durch Apoptose, die durch das proapoptotische Bak kontrolliert wird. Dessen Gegenspieler ist Bcl-xL, ein Mitglied der Bcl-2-Protein-Familie. Junge Blutplättchen enthalten mehr Bcl-xL. Da dieses die proapoptotische Aktivität hemmt, sind die jungen Zellen so vor Apoptose geschützt. Mit der Zellalterung nimmt jedoch die Bcl-xL-Konzentration ab und es kommt zur Apoptose. Dies wurde gezeigt, indem genetisch oder medikamentös die Bcl-xL-Funktion gemindert wurde. Mäuse ohne funktionierendes Bcl-xL weisen einen erhöhten Thrombozytenumsatz auf, was zu einem erhöhten Anteil von retikulierten Thrombozyten an der gesamten Population führt. Bcl-xL stellt also den Schutz vor frühzeitiger Apoptose sicher (Mason et al., 2007).

Die Möglichkeit, anhand der r-PLT-Zahl Rückschlüsse auf die Thrombogenese zu ziehen, wird primär bei Thrombopenien genutzt. Mittlerweile wurde die Aussagefähigkeit der retikulierten Thrombozyten auch in anderen Fragestellungen entdeckt. Ein weiterer zusätzlicher Einsatzbereich für die Messung der retikulierten Thrombozyten ist die Sepsis-Früherkennung. De Blasi et al. zeigten, dass bei humanen Patienten, die bei ihrer Aufnahme auf die ICU (intensive care unit) keine Sepsis zeigten, die IPF ansteigt, noch bevor eine Sepsis manifest wird (De Blasi et al., 2012). Die Erhöhung der IPF stand in einem signifikanten Zusammenhang

zu dem positiven Ergebnis der Blutkultur, wie Di Mario et al. darstellten. Sie legten Blutkulturen von Patienten mit Verdacht auf Sepsis, einer Körpertemperatur über 38°C, Neutrophilie und normalen bis erhöhten Thrombozytenzahlen an. Die IPF war bei Patienten mit positiver Blutkultur signifikant höher verglichen mit der IPF bei Patienten, deren Blutkultur negativ war. Die IPF eignet sich somit als Marker zur frühzeitigen Erkennung einer Sepsis und erlaubt ein rasches Handeln, bevor das Ergebnis der Blutkultur vorliegt (Di Mario et al., 2009).

Guthikonda et al. demonstrierten für den Menschen, dass eine erhöhte IPF mit einer gesteigerten Aspirinresistenz sowie höheren COX-2- (Cyclooxygenase-2) und Serum-Thromboxan-B2-Werten gekoppelt ist. Dieses offensichtlich verminderte Ansprechen auf Aspirin kann durch nichtinhibierte COX-1 und COX-2 bedingt sein (Guthikonda et al., 2007). Auch Cesari et al. stießen in ihrer Studie auf eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil retikulierter Thrombozyten und dem Vorliegen von RPR (residual platelet reactivity). Die erhöhte RPR trotz dualer Antiplatelet-Therapie bei Patienten, die an akutem Koronarsyndrom leiden, wurde hier zusammen mit einer Erhöhung des r-PLT-Werts beobachtet. Unklar ist noch, ob das vermehrte Vorkommen der r-PLT die erhöhte RPR auch bedingt. Dies könnte auch hier durch die bei diesen jungen Thrombozyten noch ungehemmte COX-1- und COX-2-Aktivität verursacht sein (Cesari et al., 2008).

2.3 Die Messung retikulierter Thrombozyten

Ingram und Coopersmith beschrieben als erste das Vorkommen retikulierter Thrombozyten, nachdem sie diese Zellen bei Hunden nach akutem Blutverlust feststellten. Während Ingram und Coopersmith retikulierte Thrombozyten noch unter Zuhilfenahme von mit Neumethylenblau gefärbten Blutaussstrichen untersuchten, setzte sich durch Kienast und Schmitz die durchflusszytometrische Bestimmung der retikulierten Thrombozyten durch (Ingram und Coopersmith, 1969; Kienast und Schmitz, 1990). Sie beschrieben das Anfärben mit Thiazol Orange, das schon gute Ergebnisse bei der Retikulozytenbestimmung lieferte (Lee et al., 1986). Diese Färbung dringt in die Zellen ein, ohne dass eine Vorbehandlung nötig ist, und bindet an RNA und DNA. Dadurch kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz. Thiazol Orange absorbiert und emittiert Wellenlängen im Bereich von 509 bis 533 nm. Durch

den hohen RNA-Gehalt der retikulierten Thrombozyten lassen sich diese mittels Thiazol Orange markieren.

Doch gibt es viele sich widersprechende Angaben bezüglich der RNA-spezifischen Anfärbung mit Thiazol Orange bei Thrombozyten. Mehrere Versuche haben gezeigt, dass die Färbung durch den Einsatz von RNase zum größten Teil wieder aufgehoben wird und folglich den RNA-Gehalt anzeigt (Dale et al., 1995; Salvagno et al., 2006). Andere Autoren wiederum gehen von einem zusätzlichen Anfärben der in den dichten Granula enthaltenen ADP mit Thiazol Orange aus (Ault et al., 1992; Harrison et al., 1997). Entgegen den von Salvagno et al. mit TRAP (thrombin receptor activating peptide) erzielten Ergebnissen wurde von Robinson et al. beschrieben, dass fast die Hälfte des Thiazol-Orange-Signals durch Thrombozytenaktivierung mittels TRAP aufgehoben werden konnte (Salvagno et al., 2006). Dieses Level war ähnlich bei Patienten mit einem Defekt der dichten Granula (Robinson et al., 1998). Zusätzlich zu dieser Diskrepanz kommt es zu erheblichen Unterschieden in den Referenzwerten bei unterschiedlichen Färbemethoden mit Thiazol Orange (Schmitz et al., 1998). Eine Erklärung hierfür kann das Benutzen einer größeren Thiazol-Orange-Menge oder eine längere Einwirkzeit sein (Harrison et al., 1997). Tatsächlich ist die Thiazol-Orange-Färbung der retikulierten Thrombozyten sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Eine hohe Thiazol-Orange-Konzentration sowie eine Inkubationszeit über 2,5 Stunden führen zu inakzeptabel hohen prozentualen Werten der retikulierten Thrombozyten. Dies kann auf ein unspezifisches Anfärben der dichten Granula oder anderer Zellkompartimente zurückzuführen sein (Kienast und Schmitz, 1990). Dass bei einer passenden Methode der Grad der Anfärbung unabhängig von den dichten Granula ist, zeigt ein Versuch von Joseph et al. Hierbei wurden keinerlei Veränderungen der r-PLT-Werte zwischen aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten festgestellt (Joseph et al., 1998). Weitere Unterschiede, die zu einer Diskrepanz in den Messwerten führen können, liegen eventuell an den verwendeten Antikoagulantien, der Bezugsquelle der Reagenzien, der Datenanalyse oder der Interpretation der Ergebnisse (Harrison et al., 1997). Gerade zu Beginn der Technik gab es große Probleme, die Färbung von retikulierten Thrombozyten mit Thiazol Orange zu standardisieren (Harrison und Goodall, 2008).

Eine weitere Hürde in der alleinigen Verwendung von Thiazol Orange liegt in der Trennung der r-PLT-Population von der Retikulozytenpopulation und führt daher zu eventuell fehlerhaften Messergebnissen (Ivory et al., 2007). Um dies zu vermeiden, wird oft eine Doppelmarkierung mit Thiazol Orange und einem spezifischen Thrombozytenantikörper durchgeführt (Robinson et al., 2000).

Die Schwierigkeit der Standardisierung besteht in diesem Ausmaß bei dem Einsatz von automatisierten Hämatologiesystemen nicht. Hierbei weisen die Färbebedingungen wie Inkubationszeit und Reagenz keine derartigen Schwankungen auf und die Ergebnisse sind von Gerät und Untersucher unabhängig. Zusätzlich ist die Auswahl der Zellpopulation standardisiert. Dadurch wird zwar kein auf den individuellen Patienten angepasstes Gate gewählt, es wird jedoch auch die vom jeweiligen Untersucher abhängige Varianz ausgeschlossen. Zudem ist eine Messung der r-PLT mit einem Hämatologiegerät wesentlich billiger, einfacher und zudem schneller durchführbar. Damit ist sie, im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Analyse, im Praxisalltag anwendbar.

Beim Menschen wird bereits auf vielen Gebieten der Sysmex XE-2100 zur Bestimmung der „immature platelet fraction“ genutzt. Die IPF gibt hierbei den Prozentsatz der retikulierten Thrombozyten von der ebenfalls optisch gemessenen Gesamtthrombozytenzahl an. Zudem wird von einigen Autoren die H-IPF (highly fluorescent immature platelet fraction) angegeben. Sie beschreibt die Thrombozyten mit der stärksten Fluoreszenz unter den retikulierten Thrombozyten. Jung et al. ermittelten Referenzwerte für den Menschen. Darüber hinaus wurden in dieser Studie, welche 2039 gesunde Individuen, 150 Patienten mit idiopathischer thrombozytopenischer Purpura (ITP) und 51 Patienten mit aplastischer Anämie (AA) untersuchte, Cut-Off-Werte für die Diagnose der ITP festgelegt. Hierbei liegt ein signifikanter Unterschied in den IPF-Werten von ITP und AA vor. Für die Unterscheidung zwischen diesen beiden Diagnosen wurde ein Cut-Off-Wert von 7,3 % festgelegt. Die Spezifität hierfür beträgt 54,0 % und die Sensitivität 92,2 % (Jung et al., 2010). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die IPF eine akzeptable Aussagekraft bzgl. der Thrombopoeseleistung besitzt. Dies wurde auch in einer Studie von Kickler et al. demonstriert. Hier wurde die Methode des Sysmex XE-2100 an 171 Patienten mit Thrombozytopenie sowie 80 gesunden Menschen untersucht. Es wurden drei Patientengruppen einander gegenüber gestellt, und zwar die Thrombopenie aufgrund vermehrter Thrombozytenzerstörung (beinhaltet autoimmun bedingte Thrombozytopenie und DIC unter Therapie), die Gruppe mit beginnender Wiederherstellung des Knochenmarks (nach einer myeloablativen Chemotherapie oder Knochenmarkstransplantation) und die Thrombopenie unter Suppression des Knochenmarks. Auch hier konnten mithilfe der IPF die Patienten zum größten Teil den einzelnen Gruppen zugeordnet werden. Diese Studie beweist, dass die Methode bei einem Cut-Off-Wert von 6,5 % mit einer Sensitivität von 79 % und einer Spezifität von 89 % zwischen einem vermehrten Verbrauch und einer reduzierten Bildung der Thrombozyten unterscheiden kann (Kickler et al., 2006).

Die Aussagekraft der IPF des Sysmex XE-2100 nutzt man auch bei der Entscheidung, ob Kinder nach einer Chemotherapie eine Thrombozytentransfusion benötigen. Laut Saigo et al. kann bei genügend hoher IPF und dem Nichtvorhandensein zusätzlicher Komplikationen auf die Transfusion verzichtet werden. Die erhöhte IPF kündigt hier eine ausreichende baldige Zunahme der Thrombozytenzahl an (Saigo et al., 2008). Dies wurde zudem für die Regeneration nach einer Stammzelltherapie bei Erwachsenen gezeigt. Auch hier geht der mit dem Sysmex XE-2100 gemessene Anstieg des IPF-Wertes dem der gesamten Thrombozytenzahl voraus (Zucker et al., 2006). Im Allgemeinen verhält es sich derart auch bei Kindern, die eine Stammzelltransplantation erhielten. Jedoch wurden schon Fälle in der Pädiatrie beobachtet, bei denen einem IPF-Anstieg kein Anstieg der Thrombozytenzahl folgte. Daher ist der Verzicht auf eine Thrombozytentransfusion anhand hoher IPF-Werte hier nicht zu empfehlen (Hennel et al., 2012).

Die IPF ist zusätzlich ein Parameter, um die Wahrscheinlichkeit einer Sepsis bei stationären Patienten mit Fieber oder Neutrophilie abzuschätzen (De Blasi et al., 2012; Di Mario et al., 2009). Dieser Wert ist schneller verfügbar als das Ergebnis einer Blutkultur und erlaubt den frühen Beginn der Therapie und des Antibiotikaeinsatzes. Dieses frühe Handeln trägt maßgeblich zum Überleben des Patienten bei (Di Mario et al., 2009).

Darüber hinaus ist die IPF ein hilfreicher Faktor, um das Risiko nach einem akuten Koronarsyndrom (ACS) abzuschätzen. Cesari et al. zeigten, dass ein hoher IPF-Wert signifikant mit dem Versterben des Patienten innerhalb von zwölf Monaten nach einem ACS korreliert (Cesari et al., 2013). Auch die Werte dieser Studie wurden mithilfe des Sysmex XE-2100 gewonnen.

Die beschriebenen Studien demonstrieren, wie vielfältig der Einsatz der „immature platelet fraction“ in der Humanmedizin ist. Mit dem Sysmex XE-2100 hat ein automatisiertes Hämatologiegerät mit r-PLT- und IPF-Messung Einzug in Diagnostik und Forschung erhalten, dessen Gebrauch hier inzwischen fest verankert ist.

Auch in der Tiermedizin ist die Messung der retikulierten Thrombozyten mithilfe eines hämatologischen Analysegerätes etabliert. Pankraz et al. zeigten dies für den Hund am Sysmex XT-2000iV. Hierbei verglichen sie bei 58 Hunden die entwickelte Sysmex-Methode mit der Gold-Standard-Methode, bei der durch Thiazol Orange angefärbte Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Zur exakten Identifizierung der Thrombozyten führten Pankraz et al. zusätzlich eine Inkubation mit CD61-Antikörpern durch (Pankraz et al., 2009).

Der verwendete Sysmex XT-2000iV nutzt zur r-PLT-Messung eine Supravitalfärbung, die Polymethine und Oxazine enthält und die in den Zellen enthaltene RNA färbt. Die dadurch emittierte Fluoreszenz wird im Zusammenhang mit der Zellgröße interpretiert. Folglich arbeitet sowohl der Sysmex XT-2000iV als auch die in vielen Studien beschriebene Durchflusszytometrie mittels Thiazol Orange nach einem ähnlichen Prinzip. Werden nun die beiden Parameter, Zellgröße und Fluoreszenz, gegeneinander in einem Punktwolkendiagramm (Scattergramm) aufgetragen, ergeben sich zwei Zellpopulationen. Die größeren Zellen stellen Erythrozyten und Retikulozyten dar. Deutlich kleiner sind die Thrombozyten inklusive der retikulierten Thrombozyten. Das zur r-PLT-Bestimmung von Pankraz et al. gesetzte Gate bezieht die Thrombozyten ab einer bestimmten Fluoreszenz mit ein, und zwar unabhängig von der Größe der Thrombozyten. Gemessen wurden 40 gesunde und 18 thrombozytopenische Hunde. Der Cut-Off-Wert wurde hier bei $\geq 0,975$ % r-PLT festgesetzt. Die Sensitivität, um retikulierte Thrombozyten mit dem Sysmex XT-2000iV zu erfassen, lag bei 94,74 % und die Spezifität bei 85,71 %. Hierbei lieferten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie den Vergleichswert. Pankraz et al. bezogen sich hierbei auf das Referenzintervall $1,91 \pm 1,29$ % r-PLT. Das Referenzintervall des Sysmex XT-2000iV war $0,56 \pm 0,82$ %. Für die Patientengruppe ergab sich ein Mittelwert von $3,98 \pm 3,25$ %. Außerdem wurde ein Hund mit immunmediierter Thrombozytopenie mithilfe des Analysegeräts ab Beginn der immunsuppressiven Therapie überwacht. Wie auch schon für die Verlaufskontrolle bei Hunden mittels Thiazol Orange und vielfach für den Menschen beschrieben wurde, zeigt sich auch hier die typische inverse Beziehung zwischen der Anzahl der retikulierten und der gesamten Thrombozyten (Michimoto et al., 2004). Dem Anstieg im Anteil der r-PLT folgte 24-48 Stunden später ein eindeutiger Anstieg der Thrombozytenzahl (Pankraz et al., 2009).

Auch die Arbeitsgruppe um Gelain führte die Messung der retikulierten Thrombozyten mithilfe des PLT-O-Kanals (optische Thrombozytenmessung) des Sysmex XT-2000iV durch. Bei ihrer Analyse orientierten sie sich an der von Pankraz et al. veröffentlichten Methode. Hierbei verglichen sie u. a. das morphologische Erscheinungsbild der Scattergramme sowie die relativen und absoluten Werte der retikulierten Thrombozyten von 86 gesunden Hunden, 10 Norfolk Terriern und 44 Hunden mit Thrombopenie, wobei diese in 37 Fällen durch hämatopoetische Neoplasien und in 7 Fällen durch erhöhten Verbrauch oder Zerstörung bedingt war. Für die Kontrollgruppe ergab sich hierbei ein Referenzintervall von r-PLT = $1,4 \pm 0,7$ % bzw. $4 \pm 2,5$ ($10^9/l$). Für Hunde mit nicht regenerativer Thrombopenie ergibt sich ein relativer Wert von $8,3 \pm 5,6$ % und ein absoluter Wert von $4,4 \pm 3,3$ ($10^9/l$). Die Werte der Hunde mit

regenerativer Thrombopenie waren mit $16 \pm 9,3 \%$ bzw. $10,4 \pm 10$ ($10^9/l$) deutlich erhöht (Gelain et al., 2010a).

2.4 Retikulierte Thrombozyten, Thrombozytopenie und Thrombozytengröße

Schon 1972 hat Karpatkin beschrieben, dass Thrombozyten mit zunehmendem Alter kleiner werden, weniger Proteine synthetisieren und ihren RNA-Gehalt verringern (Karpatkin, 1972). Dass unter 24 Stunden alte Thrombozyten mehr RNA enthalten und zudem vermehrt Proteine synthetisieren, wurde nachvollziehbar demonstriert (Dale et al., 1995; Kieffer et al., 1987). Zudem ist bekannt, dass sich Thrombozytenzahl und Größe zueinander gegenläufig verhalten (O'Malley et al., 1996). Die Annahme, dass junge Thrombozyten groß und gealterte klein sind, ist differenzierter zu betrachten. Auch in der Veterinärmedizin gibt es die Auffassung, dass große Thrombozyten bzw. ein hoher MPV (mean platelet volume) auf eine gesteigerte Thrombopoese hinweisen (Tvedten, 2009). Für diese Auffassung sprechen die Entdeckungen einiger Autoren. Balduini et al. beispielsweise untersuchten 13 Brustkrebspatientinnen während einer hoch dosierten Chemotherapie. Nach dem Abfall der Thrombozytenzahl ging ihr erneuter Anstieg mit einer Zunahme von MPV, PDW (platelet distribution width) und P-LCR (platelet large cell ratio) einher (Balduini et al., 1999). Kaito et al. zeigten zudem, dass MPV und besonders PDW und P-LCR bei 39 Patienten mit Immunthrombozytopenie signifikant höher waren als bei 40 Patienten mit aplastischer Anämie. Zudem zeigte sich eine ausreichende Spezifität und Sensitivität dieser Thrombozytenparameter bezüglich der Diagnose einer Immunthrombozytopenie (Kaito et al., 2005). Auch Abe et al. stellten einen signifikant höheren MPV-Wert bei humanen Patienten mit Immunthrombozytopenie fest (Abe et al., 2006). Sullivan et al. betrachteten den MPV-Wert im Zusammenhang mit dem Ergebnis einer Knochenmarksuntersuchung bei 60 thrombozytopenischen Hunden. Es ergab sich für die Aussagekraft eines hohen MPV über die adäquate Reaktion der Megakaryozyten eine Sensitivität von 88 % und eine Spezifität von 80 % (Sullivan et al., 1995).

Interessant sind auch die Versuche von McDonald et al. Hierbei wurde Ratten Antiplatelet-Serum verabreicht. An den Tagen 2,3,4,5,6 und 7 nach der Injektion wurden die Thrombozyten untersucht. Es zeigte sich, dass der MPV-Wert junger Thrombozyten grundsätzlich höher war als der von alten. Darüber hinaus war er an Tag 2 nach Injektion insgesamt höher als an allen anderen Tagen. In dieser Zeit stieg die Thrombozytenzahl noch, bis sie nach vier Tagen wieder

einen normalen Wert erreichte. Somit ist das Auftreten der großen Thrombozyten einem Anstieg der Gesamtthrombozytenzahl vorausgegangen (McDonald et al., 1964). Dieser Ablauf entspricht dem Verlauf, der bereits von der relativen Zahl der retikulierten Thrombozyten bekannt ist. Diese geht ebenfalls einem Anstieg der Gesamtthrombozytenzahl voraus. Einen vergleichbaren Versuch führten Thon et al. bei Mäusen durch. Hierbei wurde Platelet-rich-plasma von Mäusen gewonnen, und zwar vier Tage vor und vier Tage nach Injektion von Antiplatelet-Serum. Wie erwartet zeigte sich nach der Injektion eine signifikant höhere Zahl der hantelförmigen Proplatelets (Thon et al., 2012). Hantelförmige Proplatelets und Preplatelets gehen ineinander über und liegen zeitgleich im Blut vor. Daher liegt der Schluss nahe, dass es sich bei den von McDonald beobachteten großen Thrombozyten um zirkuläre Preplatelets handelte. Zudem wurden Mäusen Proplatelets transfundiert, die mittels 5-Chloromethylfluorescein-Diacetat markiert waren, und im Anschluss die Zahl der entstehenden CMFDA (5-Chloromethylfluorescein-Diacetat)-markierten Thrombozyten gemessen. Diese stieg rasch an und erreichte ihr Maximum nach 12 Stunden (Thon et al., 2010). Folglich bildeten sich in diesen 12 Stunden Thrombozyten aus den von Thon beschriebenen und applizierten Thrombozytenvorläufern. Ault et al. zeigten, wie lange der Übergang der retikulierten Thrombozyten in adulte Thrombozyten dauert. Dazu injizierten auch sie Mäusen Antiplatelet-Serum. 72 Stunden später waren zu 80 % retikulierte Thrombozyten vorhanden. Nach weiteren 24 Stunden zeichnete sich eine signifikante Population adulter Thrombozyten ab (Ault et al., 1992). Es ist folglich davon auszugehen, dass sich innerhalb dieser 24 Stunden retikulierte Thrombozyten zu Adulten entwickeln. Auffällig ist, dass sowohl einem Anstieg der retikulierten Thrombozyten als auch einer Transfusion der von Thon beschriebenen Thrombozytenvorläufer eine deutliche Zunahme der Thrombozytenzahl folgt und zwar in beiden Fällen innerhalb von 24 Stunden. Diese Tatsache spricht dafür, dass es sich bei retikulierten Thrombozyten und den genannten Thrombozytenvorläufern um Strukturen handelt, die in der zeitlichen Reihenfolge der Thrombopoese eng benachbart oder sogar identisch sind. Die Preplatelets unter den Thrombozytenvorläufern beschreiben Thon et al. als 3 bis 10 μm groß (Thon et al., 2012). Schwertz et al. beschrieben, dass sich auch thrombozytenähnliche Zellen unter 4 μm zu vermehrungsfähigen Thrombozytenvorläufern entwickelten (Schwertz et al., 2010). Daher ist davon auszugehen, dass nicht ausschließlich große sondern auch kleinere Thrombozyten bzw. thrombozytenähnliche Zellen das Ergebnis einer aktuell ablaufenden Thrombopoese sind. Hierbei muss erwähnt werden, dass Thrombozyten und retikulierte Thrombozyten in der Regel in EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)-Blutproben gemessen werden. Allerdings entwickeln sich in EDTA-Blut jedoch keine hantelförmigen Proplatelets und zirkuläre

Preplatelets stellen sich zudem anders da. Verglichen mit in Natriumcitrat-Blut vorliegenden Preplatelets erscheinen Preplatelets in EDTA-Blut kleiner und weisen dickere Mikrotubuliringe auf (Thon et al., 2012). Dieser Umstand lässt sich durch das typische Aufkugeln der Thrombozyten in EDTA-Blut erklären. Diese Veränderung der Preplatelets erschwert ihren morphologischen Vergleich mit retikulierten Thrombozyten in EDTA-Blut.

Entgegen der zuvor genannten Studien, die für einen Zusammenhang zwischen MPV und adäquater Thrombopoese sprechen, gibt es auch Argumente gegen einen solchen Zusammenhang. Kickler et al. untersuchten unter anderem die Thrombozytenzahl im Zusammenhang zu dem MPV-Wert. Stieg bei thrombozytopenischen Menschen die Thrombozytenzahl wieder auf den Normalwert an, blieb der MPV-Wert unverändert. Die HFPPF% (high fluorescent platelet fraction) normalisierte sich hingegen (Kickler et al., 2006). Abe et al. verglichen die ROC (Receiver-Operating-Characteristic)-Kurven von MPV und IPF und schlossen, dass sich die IPF deutlich besser eignet, um zwischen adäquater und inadäquater Thrombopoese zu unterscheiden (Abe et al., 2006). Diese Feststellung wird bestätigt durch die Korrelation zwischen der Megakaryozytenzahl im Knochenmark und der relativen Zahl der retikulierten Thrombozyten (Kienast und Schmitz, 1990). Dass sich der MPV-Wert nicht als Ersatz für die relative Zahl der retikulierten Thrombozyten eignet, wurde in verschiedenen humanmedizinischen Studien demonstriert (Salvagno et al., 2006; Di Mario et al., 2009; Joutsio-Korhonen et al., 2000). Auch in der Veterinärmedizin gibt es Zweifel an dem Zusammenhang zwischen Thrombopoese und Thrombozytengröße. In der Studie von Pankraz et al. existierte kein signifikanter Unterschied zwischen MPV, PDW und P-LCR zwischen 40 gesunden und 8 kranken Hunden, die entweder eine Thrombozytopenie oder normale Thrombozytenzahlen mit einer gesteigerten Thrombopoese zeigten (Pankraz et al., 2009). Eine bereits erwähnte und für die Humanmedizin beschriebene inverse Beziehung zwischen Thrombozytenzahl und -größe beobachteten Santoro et al. beim Greyhound (Santoro et al., 2007). Auch interessant ist eine Studie über die Blutwerte von Sibirian Huskys. Sassnau beschrieb eine Veränderung der Thrombozytenzahl und -größe in Abhängigkeit vom Training der Hunde. Verglichen mit den Blutwerten von 15 Tieren nach einer circa fünfmonatigen Ruhephase veränderten sich die beiden Thrombozytenwerte nach der fünfmonatigen Trainingsphase signifikant. Es kam zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl und einer Verringerung des MPV (Sassnau, 2007). Zudem kommen erhöhte MPV- und PDW-Werte laut Moritz et al. bei Hunden mit inflammatorischen Erkrankungen vor (Moritz et al., 2005).

Bommer et al. zeigten, dass es keine diagnostische Beziehung zwischen den Gründen für die Thrombopenie bei 159 Hunden und den Werten MPV, PDW und Large Platelets gibt. In vielen

Fällen wurde jedoch auch hier eine inverse Beziehung zwischen Thrombozytenzahl und –größe und auch zwischen Thrombozytenzahl und PDW beobachtet. Zudem gab es Tiere, die zwar große Thrombozyten aufwiesen, bei denen jedoch aufgrund der Erkrankung nicht mit einem Anstieg der Thrombozytenzahl zu rechnen war (Bommer et al., 2008). Folglich können diese Thrombozytenparameter anscheinend nicht zur klinischen Interpretation der Thrombozytopenie beitragen. Northern et al. beschrieben, dass drei von neun Hunden mit einer Makrothrombozytose eine primäre Knochenmarkserkrankung hatten (Northern und Tvedten, 1992).

Auch mit einigen Erbkrankheiten geht eine Makrothrombozytose einher. So haben Cavalier King Charles Spaniel mit einem β 1-Tubulin-Defekt deutlich größere Thrombozyten, was sich auch in einem erhöhten MPV bemerkbar macht. β 1-Tubulin ist eine Isoform des β -Tubulin und kommt primär in Megakaryozyten und Thrombozyten vor (Davis et al., 2008). Es ist verantwortlich für die Mikrotubulieausbildung und –struktur in Thrombozyten, für den Erhalt der typischen diskoiden Thrombozytenform und für die Proplatelet-Bildung (Schwer et al., 2001). Bei Cavalier King Charles Spaniels mit β 1-Tubulin-Defekt zeigt sich in der Fluoreszenzmikroskopie ein stark verändertes Bild der Mikrotubuli. Im Vergleich zu gesunden Hunden sind die Mikrotubuli bei betroffenen Hunden weder intakt noch kontinuierlich im Randbereich der nicht aktivierten Thrombozyten angeordnet. Stattdessen erscheint ihre Struktur granulär und diskontinuierlich. Dieses Bild tritt sowohl bei für diesen Defekt homo- als auch heterozygoten Hunden auf (Davis et al., 2008). Während bei Cavalier King Charles Spaniels mit Makrothrombozytose oft niedrige Thrombozytenzahlen auftreten, kann der Thrombokrit durchaus normal sein. Dieser muss jedoch, um aussagekräftig zu sein, mithilfe des QBC (quantitative buffy coat) gemessen werden (Bertazzolo et al., 2007). Zudem stellten Bertazzolo et al. einen signifikant höheren Anteil der Thiazol-Orange-positiven Thrombozyten bei Cavalier King Charles Spaniels im Vergleich zu Kontrollhunden fest (Bertazzolo et al., 2007). Dazu passend zeigt das Zytogramm der optischen Thrombozytenanalyse mit dem Sysmex XT-2000iV bei betroffenen Cavalier King Charles Spaniels eine verschobene Verteilung der Thrombozytenpopulation hin zu RNA-reichen größeren Thrombozyten, wenn man das Zytogramm mit dem eines nicht betroffenen Spaniels vergleicht (Tvedten et al., 2008). Auch beim Norfolk Terrier kommt eine vererbte Form der Makrothrombozytose vor. Gelain et al. untersuchten eine Gruppe von 14 miteinander verwandten, klinisch gesunden Norfolk-Terriern. 11 dieser Hunde wiesen eine Makrothrombozytose sowie bei der manuellen und der Impedanz-Zellzählung Thrombozytenzahlen unter $100 \times 10^9/l$ auf. Die mittels QBC ermittelte Thrombozytenzahl war jedoch normal (Gelain et al., 2010b). Im Rahmen einer anderen Studie

wurde eine Gruppe von 20 gesunden Norfolk und Cairn Terriern untersucht. Zwar war bei keinem der Hunde die bei Cavalier King Charles Spaniels bekannte Punktmutation im β 1-Tubulin-Gen zu finden, doch wiesen 11 der Hunde eine andere Punktmutation im β 1-Tubulin-Gen auf. Vier dieser Hunde waren homozygot betroffen und es zeigte sich bei diesen vier Hunden eine Makrothrombozytopenie mit Thrombozytenzahlen zwischen 19 000 und 110 000 PLTs/ μ l. Im Gegensatz zu der bei Cavalier King Charles Spaniels entdeckten Mutation trat bei lediglich heterozygot betroffenen Hunden weder eine Makrothrombozytose noch eine Thrombozytopenie auf. Aufgrund der Position der Mutation wird vermutet, dass bei homozygotem Auftreten die GTP (Guanosintriphosphat)-Bindung derart beeinträchtigt ist, dass die Thrombozytenbildung gestört ist (Gelain et al., 2012). Betrachtet man die mit dem Sysmex XT-2000iV gemessenen r-PLT bei Norfolkterriern mit Makrothrombozytopenie, fällt auf, dass hier sowohl die relativen als auch die absoluten Werte signifikant erhöht sind. Darüber hinaus übertreffen sie sogar die Resultate, die bei Hunden mit Thrombozytopenie durch erhöhten Verbrauch oder gesteigerte Zerstörung, also bei vermutlich regenerativer Thrombozytopenie, gemessen wurden. Die Scattergramme der Norfolk Terrier mit Makrothrombozytopenie ähneln stark den Scattergrammen von Hunden mit hohen relativen r-PLT-Werten (Gelain et al., 2010a). Dies wurde auch bei Cavalier King Charles Spaniels mit Makrothrombozytose beobachtet (Tvedten et al., 2008).

Daher liegt der Schluss nahe, dass retikulierte Thrombozyten in ihrer Morphologie stark den Makrothrombozyten der Norfolk Terrier und Cavalier King Charles Spaniels ähneln. Thon et al. wiesen darauf hin, dass die Umformung von zirkulären Preplatelets in hantelförmige Proplatelets und damit auch die Entwicklung vom Preplatelet hin zu einzelnen Thrombozyten stark von der Dicke und dem Durchmesser der Mikrotubuli-Windungen abhängt. Dazu passend weisen große Thrombozyten bei Patienten mit dem Gray-PLT-Syndrom, der May-Hegglin-Anomalie und dem Epstein-Syndrom 20- bis 30-fach erhöhte Zahlen an peripheren Mikrotubuli-Windungen auf. Zusätzlich sind die meisten dieser Makrothrombozyten eher von kugelig als von diskoider Form. Dies könnte damit zusammen hängen, dass ihre zahlreichen peripheren Mikrotubuli wie Wollknäule angeordnet sind (Thon et al., 2012). Möglicherweise findet bei diesen Thrombozyten aufgrund der veränderten Mikrotubulianordnung keine Bildung von hantelförmigen Proplatelets aus Preplatelets und somit keine Teilung in normalgroße Thrombozyten statt. Der gleiche Mechanismus könnte bei den großen Thrombozyten der Norfolk Terrier vorliegen, sodass auch ihre Preplatelets nicht in der Lage sind sich weiterzuentwickeln. Dies könnte die Makrothrombozytose, die hohe Zahl an retikulierten Thrombozyten und die an retikulierte Thrombozyten erinnernde Zellpopulation der

Scattergramme erklären. Somit sind auch, wie schon beobachtet, Makrothrombozyten der Norfolk Terrier und Cavalier King Charles Spaniels ohne weitere Untersuchungen nicht von retikulierten Thrombozyten zu unterscheiden (Gelain et al., 2010a; Tvedten et al., 2008).

Wie aus diesen Erläuterungen und den widersprüchlichen bisherigen Ergebnissen zu der Beziehung zwischen Thrombozytenzahl, -größe und -nachbildung hervorgeht, ist die Theorie der jungen großen Thrombozyten vor allem beim Hund noch nicht ausreichend geklärt.

2.5 Messprinzipien des Sysmex XT-2000iV

Abbildung 1; (Quelle: mit freundlicher Genehmigung der Sysmex Europe GmbH)



Das vollautomatische Hämatologiesystem Sysmex XT-2000iV arbeitet bei der Analyse mit einer Kombination aus Impedanztechnologie und Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Dabei werden folgende Leistungen geboten:

Fluoreszenz-Durchflusszytometrie:

- Leukozytendifferenzierung (WBC DIFF)
- Retikulozytenmessung (RET)
- Thrombozytenmessung (PLT-O)

Impedanzmethode:

- Erythrozytenmessung (RBC)
- Hämatokritbestimmung (HCT)
- Thrombozytenmessung (PLT-I)

Cyanid-freie Sodiumlaurylsulfat (SLS) -Methode:

- Hämoglobinbestimmung (HGB)

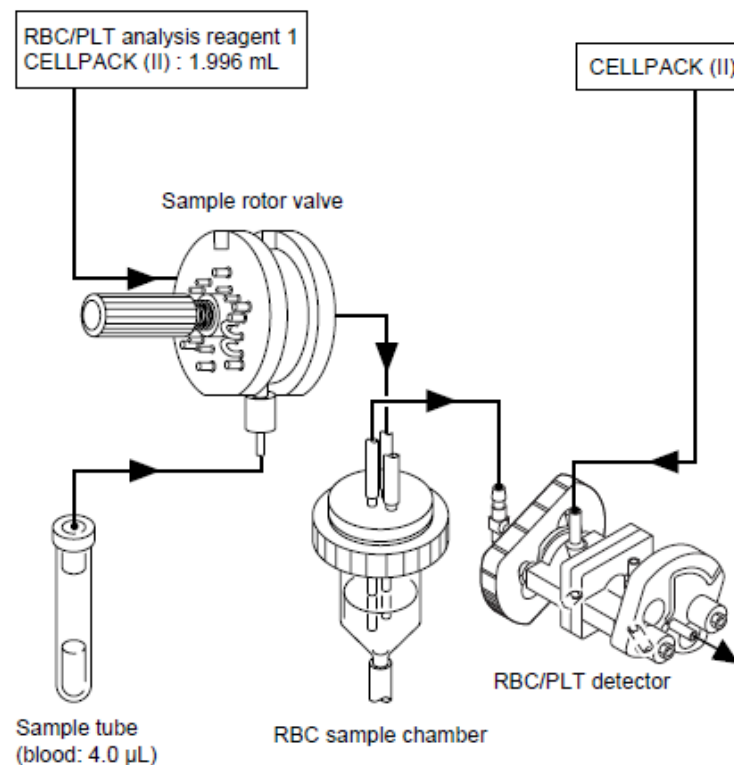
Im Folgenden werden die für die Thrombozyten- und Retikulozyten-Analytik relevanten Abläufe beschrieben.

2.5.1 Impedanzmessung

Die Bestimmung der Thrombozyten und Erythrozyten geschieht in der Regel mittels der Impedanzmethode. Zunächst werden 4 µl des EDTA-antikoagulierten Vollblutes durch eine Pumpe angesaugt und mittels des Probendosierventils im Verhältnis 1:500 mit der CELLPACK-Lösung verdünnt, bevor die so verdünnte Probe in die RBC-Reaktionskammer gelangt. 11,7 µl der verdünnten Probe gelangen nun in den RBC/PLT-Detektor. Hier wird die hydrodynamische Fokussierung genutzt. Nach ihrem Eintritt in die konische Kammer wird die verdünnte Probe von einer Mantelflüssigkeit umhüllt (Sysmex Corporation, 2012). Durch die unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten von Proben- und Mantelstrom entsteht eine laminare Strömung, sodass die Zellen vereinzelt und in Reihe durch den Messbereich fließen. So wird das Auftreten von abnormalen Zellimpulsen verhindert, eine Kontamination der Flusszelle reduziert und die Genauigkeit der Messung erhöht (Sysmex Corporation, 2012; Moritz, 2000).

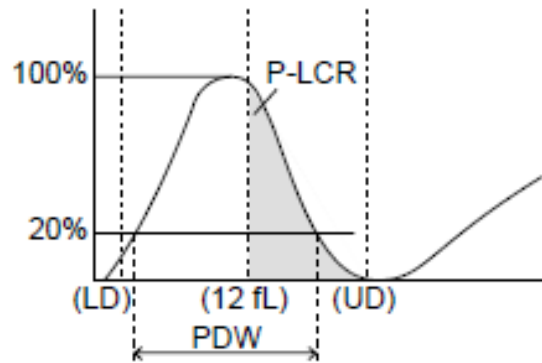
Die vereinzelt Zellen werden durch eine kapillare Öffnung gesaugt. Beidseits dieser Messöffnung befinden sich zwei Elektroden, zwischen denen Gleichstrom fließt. Durchfließt nun eine Zelle diesen Bereich zwischen den Elektroden, erhöht sich kurzzeitig der Widerstand, da Blutzellen weniger leitfähig sind als die umgebene Elektrolytlösung. Für jeden Zelltyp und jede Tierart sind unterschiedliche Schwellenwerte (thresholds) festgelegt. Wenn sich der von der durchquerenden Zelle verursachte elektrische Impuls zwischen einem oberen und unteren Schwellenwert (25 und 250 fl, Erythrozyten) befindet, wird er verstärkt und gezählt (Dunker, 2011). Damit wird die Zelle erfasst, wobei die Impulshöhe proportional zum Zellvolumen und die Anzahl der Impulse proportional zu der Zellzahl ist (Nakagawa, 2010). Diese Größen werden in Histogrammen dargestellt. Bei der automatischen Auswertung der Volumenverteilungskurven kommen unterschiedliche Diskriminatoren zum Einsatz. Der Messbereich für die Thrombozyten befindet sich zwischen 2 und 30 fl (Dunker, 2011).

Abbildung 2; Stationen der Erythrozyten-/Thrombozytenanalyse (Quelle: Software of Automated Hematology Analyzer for Animal, XT-2000iV/XT-1800iV, Instructions for Use (Sysmex Corporation, 2012), mit freundlicher Genehmigung der Sysmex Europe GmbH)



Die Diskriminatoren sind variable Schwellenwerte, die sich innerhalb gewisser vorgegebener Grenzen befinden, sich aber innerhalb dieser automatisch das entsprechende Tal zwischen den Zellpopulationen suchen. Der untere Diskriminator (PL) liegt hierbei zwischen 2 und 6 fL und der obere zwischen 12 und 30 fl. Zusätzlich gibt es für die Messung der großen Thrombozyten einen fixen Diskriminator bei 12 fl. Er gibt die großen Thrombozyten bezogen auf die Gesamtthrombozytenzahl an (PLCR, platelet large cell ratio). Zudem wird die Gesamtverteilungsbreite (PDW, platelet distribution width) berechnet und angegeben. Betrachtet man die Thrombozytenverteilungskurve, wird die Grenze für die PDW im unteren und oberen Größenbereich jeweils bei 20 % der maximalen Kurvenhöhe festgesetzt (Sysmex Corporation, 2012).

Abbildung 3; Thrombozytenverteilungskurve (Quelle: Software of Automated Hematology Analyzer for Animal, XT-2000iV/XT-1800iV, Instructions for Use (Sysmex Corporation, 2012), mit freundlicher Genehmigung der Sysmex Europe GmbH): Die Grenze für die Gesamtverteilungsbreite (PDW) befindet sich bei 20 % der maximalen Kurvenhöhe.



Eine weitere ausgegebene Größe ist der Thrombozytenkrit (PCT, platelet hematocrit, platelet volume ratio). Das Thrombozytenvolumen wird als MPV (mean platelet volume) angegeben und nach folgender Formel berechnet:

$$MPV (fl) = \frac{PCT (\%)}{PLT (* 10^3 / \mu l)} * 10000$$

(Sysmex Corporation, 2012)

Es ergeben sich für den Impedanzkanal die folgenden Thrombozytenparameter:

- Thrombozytenzahl (PLT-I)
- Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV)
- Prozentuale Zahl der großen Thrombozyten (P-LCR)
- Thrombozytenverteilungsbreite (PDW)
- Thrombozytenkrit (PCT)

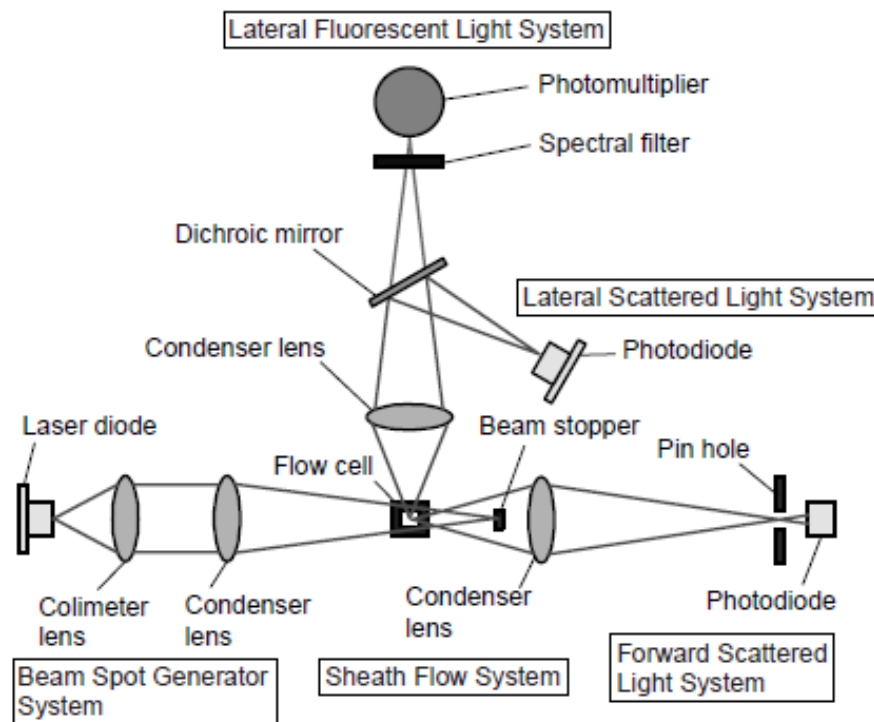
Der Kurvenverlauf wird automatisch überprüft. Bei Abweichungen gibt der XT-2000iV entsprechende Warnhinweise (flags) an. So wird der Anwender auf eventuelle Störfaktoren wie Riesenthrombozyten, Mikroerythrozyten oder fragmentierte Thrombozyten hingewiesen. Ergebnisse, die durch Anomalien nur unzureichend verlässlich sind, werden mit „*“ oder „----“ kenntlich gemacht. Der Asterisk bedeutet hierbei, dass die angezeigten Ergebnisse wenig verlässlich sind. Die Bindestriche geben an, dass aufgrund eines Analysefehlers keine Daten ermittelt werden können (Sysmex Corporation, 2012). Bei abnormalen Impedanzkurven bietet der Sysmex XT-2000iV die Möglichkeit, bei der Thrombozytenmessung auf die Lasermethode auszuweichen. Auf dieses Vorgehen weist das Gerät durch einen Warnhinweis in Form eines „&“-Zeichens hinter der Thrombozytenzahl hin (Dunker, 2011). Dem Nutzer steht zudem die Möglichkeit offen, bei der Informationsquelle für die Thrombozytenzahl frei zwischen dem Impedanz- und dem optischen Kanal zu wählen.

2.5.2 Optische Messung

Retikulozyten, Thrombozyten und retikulierte Thrombozyten erfasst der Sysmex XT-2000iV optisch. Hierfür werden 4 µl EDTA-antikoaguliertes Vollblut benötigt (Sysmex Corporation, 2012). In diesem liegen Thrombozyten bereits in isovolumetrisch aufgekugelter Form vor, sodass es nicht zu Fehlmessungen aufgrund der variierenden Ausrichtung der asymmetrischen bikonkaven Zellen kommt (Moritz, 2000). Das Blut wird mit der manuellen Aspirationspipette aspiriert und gelangt in das Probenrotorventil. Hier werden nun die genannten 4 µl des EDTA-antikoagulierten Vollblutes abgemessen und mit 0,996 ml „RET SEARCH (II) diluent“ versetzt. Von hier aus gelangt die so verdünnte Probe in die Reaktionskammer und wird im Verhältnis

1:255 mit 20 µl „RET SEARCH (II) dye solution“ versetzt (Sysmex Corporation, 2012). Der erste Zusatz perforiert die Zellmembranen von Erythrozyten, Retikulozyten, Thrombozyten, retikulierten Thrombozyten und Leukozyten, sodass im zweiten Schritt durch „RET SEARCH (II) dye solution“ eine quantitative Anfärbung der Nukleinsäuren erreicht wird (Dunker, 2011). Nach einer Reaktionszeit von 31 Sekunden ist die Probe gefärbt. 2,8 µl der gefärbten Probe werden nun im optischen Detektorblock mittels Durchflusszytometrie und Einsatz eines Halbleiterlasers bei einer Wellenlänge von 633 nm analysiert. Die Zählung und Einteilung der Zellen wird mittels Vorwärtstreulicht und Intensität der Fluoreszenz erreicht. Auch hier kommt die oben bereits beschriebene hydrodynamische Zellfokussierung zum Einsatz, sodass die Zellen vereinzelt und in Reihe die Flusszelle durchqueren. Dabei trifft der Strahl eines Halbleiterlasers auf jede einzelne Zelle (Sysmex Corporation, 2012).

Abbildung 4; Prinzip der lasergestützten Fluoreszenzdurchflusszytometrie (Quelle: Software of Automated Hematology Analyzer for Animal, XT-2000iV/XT-1800iV, Instructions for Use (Sysmex Corporation, 2012), mit freundlicher Genehmigung der Sysmex Europe GmbH): Es werden Vorwärtstreulicht, Seitwärtstreulicht und Fluoreszenzintensität erfasst.



Trifft der Laserstrahl nun auf eine Zelle, wird sein Licht in verschiedene Richtung gestreut. Die Intensität des Streulichts ist von verschiedenen Faktoren, wie Zellgröße, Zellgranularität und dem Winkel der Detektion, abhängig (Sysmex Corporation, 2012). Erfasst und verarbeitet wird das Streulicht von Photodetektoren (Photodioden), die in definierten Winkelbereichen angebracht sind. Das Vorwärtsstreulicht (Kleinwinkelstreulicht, $1 - 6^\circ$) ist ein relatives Maß für die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (Großwinkelstreulicht, $> 8^\circ$) eine Aussage über die intrazelluläre Beschaffenheit ermöglicht (Moritz, 2000).

In den optischen Detektorblock ist zudem die Messung der Fluoreszenz integriert. Wenn Licht auf speziell gefärbte, fluoreszierende Zellen trifft, entsteht Licht einer größeren Wellenlänge, verglichen mit der des ursprünglich auftreffenden Lichtes. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes ist hierbei proportional zur Konzentration des Farbstoffes und dadurch proportional zum DNA- bzw. RNA-Gehalt der Zellen. Der XT-2000iV erfasst das seitwärts emittierte Fluoreszenzlicht (Sysmex Corporation, 2012). Die Intensität des Fluoreszenzlichts (DNA-/RNA-Gehalt) wird in Beziehung zu dem Vorwärtsstreulicht (Zellgröße) gesetzt, wodurch die Abgrenzung der Erythrozyten, Retikulozyten, Thrombozyten und retikulierten Thrombozyten möglich wird. In dem entsprechenden Scattergramm werden die Intensität des seitlichen Fluoreszenzlichtes auf der x-Achse und die des Vorwärtsstreulichts auf der y-Achse aufgetragen. Die ausgegebenen Werte beinhalten die prozentuale und absolute Retikulozytenzahl, ihre Verteilungsbreite (RDW), die Erythrozyten- und die Thrombozytenzahl. Darüber hinaus werden die Retikulozyten in eine niedrig-, mittel- und hochfluoreszierende Fraktion (LFR, MFR, HFR) eingeteilt und deren prozentuale Zahlen berechnet. Die „Immature Reticulocyte Fraction“ (IRF) beinhaltet die mittlere fluoreszierende (MFR) und die hochfluoreszierende Fraktion (HFR) (Sysmex Corporation, 2012).

Abbildung 5; RET-Scattergramm, x-Achse: Intensität der Seitenfluoreszenz (SFL), y-Achse: Intensität des Vorwärtsstreulichts (FSC) (Quelle: Software of Automated Hematology Analyzer for Animal, XT-2000iV/XT-1800iV, Instructions for Use (Sysmex Corporation, 2012), mit freundlicher Genehmigung der Sysmex Europe GmbH): Durch die kombinierte Betrachtung der Fluoreszenzintensität und des Vorwärtsstreulichts wird die Abgrenzung von Erythrozyten, Retikulozyten und Thrombozyten möglich.

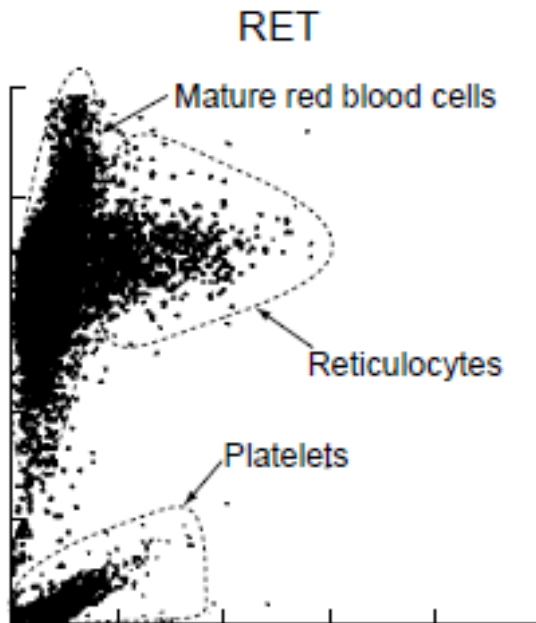
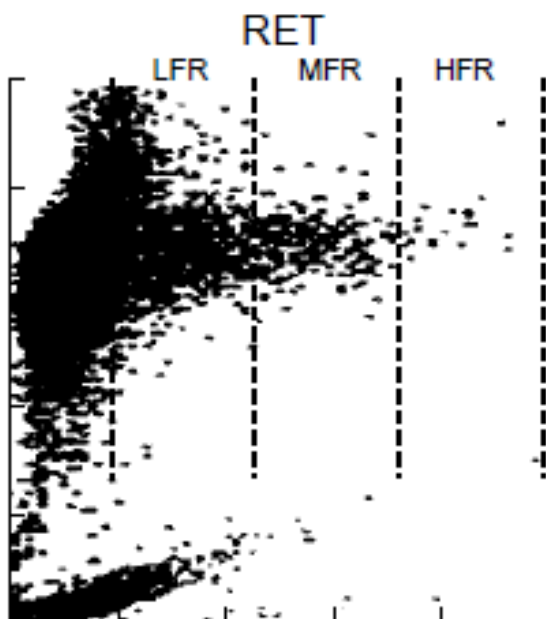


Abbildung 6; Einteilung in drei RET-Zonen anhand der Intensität des Fluoreszenzlichtes (Quelle: Software of Automated Hematology Analyzer for Animal, XT-2000iV/XT-1800iV, Instructions for Use (Sysmex Corporation, 2012), mit freundlicher Genehmigung der Sysmex Europe GmbH): Mit zunehmender Fluoreszenzintensität nimmt der Reifungsgrad der Zellen ab.



Folglich ergeben sich aus dem RET-Kanal diese Parameter:

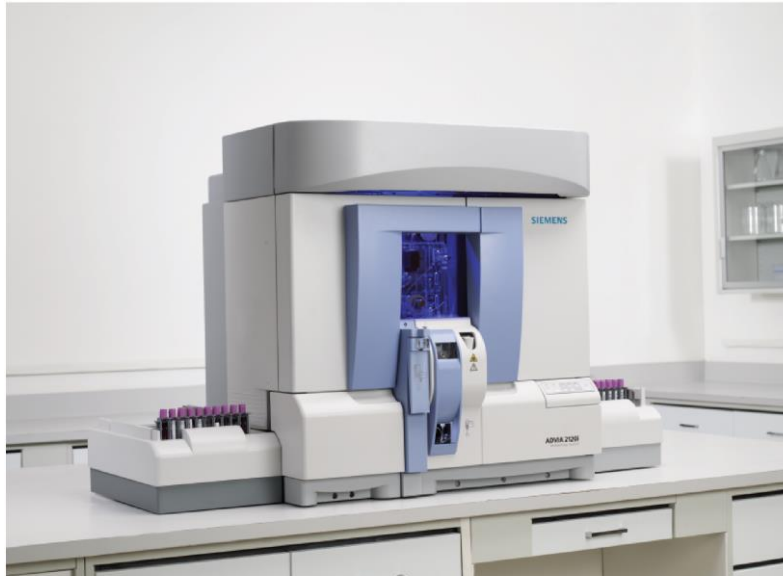
- Thrombozytenzahl (PLT-O)
- Relative und absolute Retikulozytenzahl (RET (%, #))
- Anteil der Retikulozyten mit niedriger Fluoreszenz (LFR)
- Anteil der Retikulozyten mit mittlerer Fluoreszenz (MFR)
- Anteil der Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz (HFR)
- Fraktion der unreifen Retikulozyten (IRF)

Die Zahl der retikulierten Thrombozyten wird nicht standardmäßig angegeben. Durch das Festlegen eines manuellen Gates ist die Detektion dieser Zellen jedoch möglich, wie Pankraz et al. zeigten (Pankraz et al., 2009). Beim Sysmex XT-2000iV ist es dem Nutzer grundsätzlich möglich, eine Zellpopulation mithilfe eines Gates selbst einzugrenzen. Diese Einstellungen können gespeichert und bei der Analyse von weiteren Proben wiederholt angewandt werden, sodass eine auf die Bedürfnisse des einzelnen Nutzers angepasste Analyse realisiert wird.

Bei abnormaler Impedanzkurve der Thrombozyten aus dem Erythrozyten- und Thrombozytenkanal, wird auf den Thrombozytenwert des RET-Kanals zurückgegriffen. Durch das Erfassen der Zellaktivität mittels Fluoreszenz können Erythrozyten und Thrombozyten besser voneinander unterschieden werden. Einen automatischen Wechsel der Bezugsquelle zeigt das Gerät in Form eines „&“-Zeichens hinter der Thrombozytenzahl an (Dunker, 2011). Zudem kann der Nutzer wählen, ob er standardmäßig den Thrombozytenwert aus dem Impedanz- oder dem optischen Kanal beziehen möchte.

2.6 Messprinzipien des ADVIA 120/2120

Abbildung 7; (Quelle: ADVIA 2120i/2120/120 Trainingshandbuch (Siemens, 2009), mit freundlicher Genehmigung von Siemens Healthcare Diagnostics)



Der ADVIA 120/2120 ist ein vollautomatisches Hämatologiesystem. Der Probendurchsatz beträgt 120 Vollblutproben in der Stunde. Die Messtechnologie des ADVIA 120/2120 basiert auf einer Doppelwinkel-Laser-Streulicht-Messung. Mithilfe der Multispezies-Software liefert das Gerät in der Veterinärmedizin folgende Ergebnisse:

- Kleines Blutbild (CBC)
- Kleines Blutbild und Leukozyten-Differenzierung (CBC/DIFF)
- Absolute, prozentuale und Index-Zahlen der Retikulozyten (RETI)
- CBC/DIFF und RETI (CBC/DIFF/RETI)
- CBC/RETI (Siemens, 2009)

Im Folgenden werden die für die Thrombozyten- und Retikulozyten-Messung relevanten Eigenschaften des ADVIA 120/2120 erläutert.

Zunächst wird die zu messende Probe eingesaugt und durch das Scherventil anteilmäßig für die verschiedenen Tests aufgeteilt. Der Probenanteil wird mit dem passenden Reagenz in die entsprechende Reaktionskammer geleitet, in der die Mischung und die zytochemische Reaktion ablaufen (Siemens, 2009). Nachfolgend gelangt eine konstante Menge der aufbereiteten Probe in die Flusszelle. Dabei ist sie von einem Mantelstrom umgeben und fließt mit diesem zusammen in die Flusszelle ein. Der Mantelstrom kanalisiert den Probenfluss und führt so gemeinsam mit dem kleinen Kapillarlumen dazu, dass die Zellen die Flusszelle einzeln passieren (Siemens, 2005; Moritz, 2000). Eine Durchmischung kommt jedoch nicht zustande. Beide Flüssigkeiten fließen in unterschiedlicher Geschwindigkeit, sodass die laminare Strömung einer Durchmischung entgegenwirkt (Moritz, 2000). Zudem verhindert der optisch transparente Mantelstrom den direkten Kontakt der Probe zur Flusszelle, wodurch Verstopfungen und Verfärbungen und somit eine Beeinträchtigung der Messung verhindert werden (Siemens, 2005). Die Flusszelle selbst besteht aus Quarz, durch welches Licht, einschließlich UV-Licht, ungehindert passieren kann (Moritz, 2000).

Die Flusszelle ist in die Laser-Optik eingebettet, die zudem einen Illuminator und Detektoren enthält. In dem Illuminator befindet sich bei dem ADVIA 120/2120 eine Laserdiode, die eine Wellenlänge von 670 nm erzeugt (Siemens, 2009). Ihr Licht ist auf die Flusszelle gerichtet und auf den zu erwartenden Durchmesser des zu messenden Partikels fokussiert (Moritz, 2000). Dadurch und durch die hydrodynamische Fokussierung werden die größtmögliche Einwirkung auf die Zelle und der geringstmögliche Fehler durch Mehrfachreflexionen erzielt. Die im Flusstrom enthaltenen Zellen passieren den Laserstrahl, wodurch es zur Streuung und, zusätzlich bei den Retikulozyten, zur Absorption kommt (Siemens, 2005). Physikalisch setzt sich die Streuung aus Lichtbeugung, Lichtbrechung und Reflexion zusammen. Bei der Erythrozyten/Thrombozyten-Methode und der Retikulozytenmethode werden das Kleinwinkelstreulicht bei 2 - 3° und das Großwinkelstreulicht bei 5 - 15° von Detektoren erfasst. Ein weiterer Detektor registriert die Absorption. Die Photodetektoren wandeln die optischen Informationen in elektrische Signale um. Das Kleinwinkelstreulicht liefert Informationen über die Zellgröße, während das Großwinkelstreulicht uns Daten über die intrazelluläre Beschaffenheit der Zelle und insbesondere über ihre Granularität liefert (Moritz, 2000).

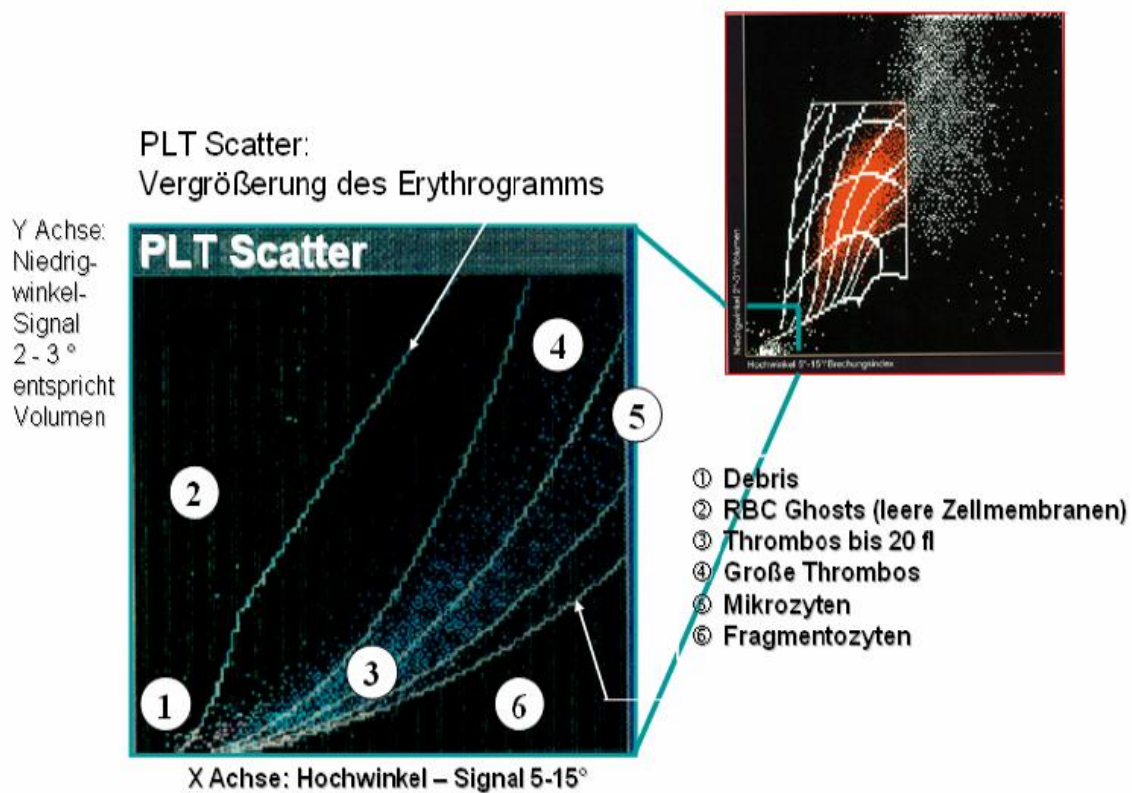
2.6.1 Erythrozyten-/Thrombozyten-Methode

Erythrozyten und Thrombozyten werden beide in der ERY-Reaktionskammer vorbereitet und anschließend simultan im selben Kanal und mit derselben Technik gemessen.

Bei der zytochemischen Reaktion der Erythrozyten- und Thrombozyten-Methode werden die Erythrozyten zunächst in der Reaktionskammer ohne Volumenänderung mithilfe von Laurylsulfat aufgekugelt (Siemens, 2005). Die Thrombozyten sind bereits durch das Antikoagulanzen EDTA aufgekugelt (Moritz, 2000). Dadurch scheidet die individuelle Form als Variabilitätsfaktor aus. Im zweiten Schritt werden die Erythrozyten und Thrombozyten mit Glutaraldehyd fixiert (Siemens, 2005). Nun fließt ein konstanter Probenstrom aus der ERY-Reaktionskammer durch die Flusszelle. Dabei wird dieser komplett von der Spüllösung (Sheath-Rinse-Reagenz) umschlossen. Es kommt zur hydrodynamischen Fokussierung, wodurch jede Zelle einzeln gemessen und beurteilt wird (Siemens, 2009). Im Laser-Messkanal werden bei 670 nm die Vorwärtsstreulichtsignale jeder Zelle im Niedrigwinkel ($2 - 3^\circ$) und Hochwinkel ($5 - 15^\circ$) von Detektoren aufgefangen. Diese beiden Streulichtsignale werden aufgezeichnet, elektronisch verstärkt und in vier Signale zerlegt. Zur Analyse der Erythrozyten dienen ein Kleinwinkelstreulichtsignal und ein Großwinkelstreulichtsignal. Außerdem wird zur Analyse der Thrombozyten ein Kleinwinkelstreulicht um das 30-fache und ein Großwinkelstreulicht um das 12-fache verstärkt (Siemens, 2005). Bei der Thrombozytenanalytik werden die Doppelwinkelsignale jeder Zelle mithilfe der MIE-Mappe in das individuelle Zellvolumen und den Brechungsindex umgerechnet (Siemens, 2009). Der Brechungsindex liegt für den Thrombozyten bei 1,35 - 1,4. Durch Einbeziehung des Brechungsindex werden Thrombozyten bis zu einer Größe von 60 fl erfasst. Thrombozyten mit einem Volumen von über 20 fl werden als große Thrombozyten (LPLT) registriert und anteilig (%GR. THROMBOS, %LPLT) angegeben. Dieser Parameter basiert auf der integrierten Analyse, die der Unterscheidung von Thrombozyten, großen Thrombozyten, Erythrozyten, ERY-Fragmenten und ERY-Ghost-Signalen dient (Siemens, 2005).

Thrombozyten sind in der MIE-Mappe im unteren linken Ursprungsbereich angesiedelt. Genauer betrachtet werden die Thrombozyten im PLT-Scatter.

Abbildung 8; PLT-Scatter und MIE-Mappe (Quelle: ADVIA 2120i/2120/120 Trainingshandbuch (Siemens, 2009), mit freundlicher Genehmigung von Siemens Healthcare Diagnostics): Mithilfe der MIE-Mappe werden Doppelwinkelsignale jeder Zelle in individuelles Zellvolumen und Brechungsindex umgerechnet. Die genauere Betrachtung der Thrombozyten erfolgt im PLT-Scatter.



Bei dieser 2D-Thrombozytenmessmethode werden die Anzahl (PLT, 10^9 Zellen/l), die Größe und die Größenverteilung gemessen. Zudem werden ermittelt:

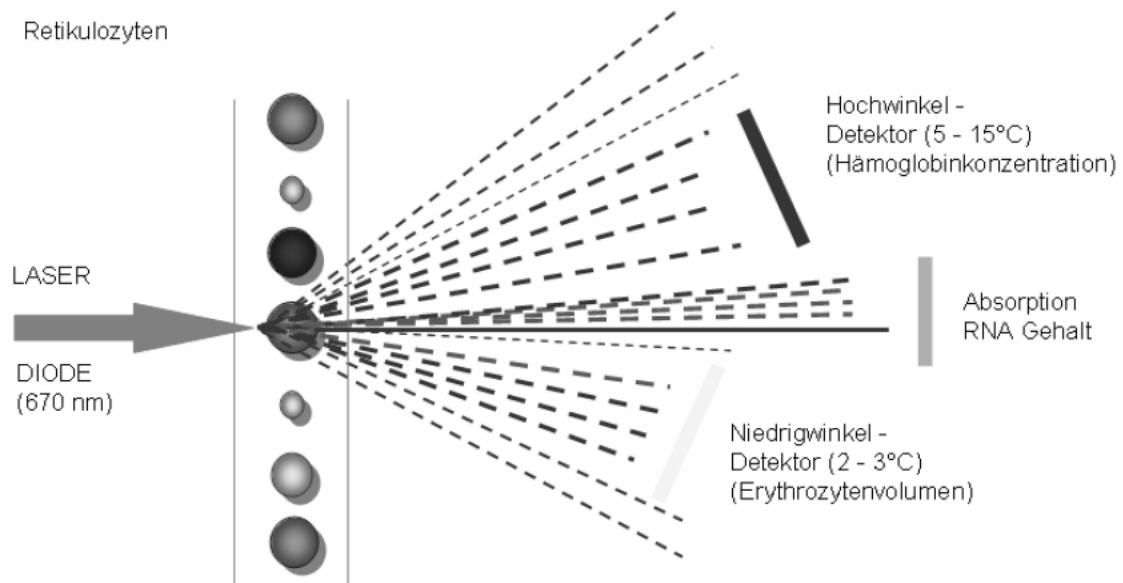
- MPV: das mittlere Thrombozytenvolumen (fl)
- PCT: der Thrombokrit (%)
- Large_PLT: die großen Thrombozyten (large platelets, 10^3 cells/ μ l)
- PDW: die Thrombozytenverteilungsbreite (platelet distribution width, %); die PDW kann auch als Standardabweichung der Thrombozytenverteilungskurve um das Maximum in % beschrieben werden
- MPC: die mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile oder die Thrombozytendichte, die den Granula der Thrombozyten entspricht (mean platelet component concentration, g/dl); sie ist mit der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten zu vergleichen (MCHC)

- PCDW: die Verteilungsbreite der „mean platelet component concentration“ (g/dl); sie ist ein Maß für die Anisozytose der Thrombozyten und entspricht der Hämoglobinverteilungsbreite der Erythrozyten
- MPM; die mittlere Thrombozytenmasse (Mean Platelet Mass, pg); sie ist das Produkt aus MPV und MPC/100 und ist die Entsprechung der Thrombozyten zum mittleren Hämoglobingehalt der Erythrozyten (MCH)
- PMDW: die Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse (Platelet Mass Distribution Width, pg)
- RBC Fragments: Erythrozytenfragmente; diese enthalten Hämoglobin
- RBC Ghosts: leere Erythrozytenmembranen ohne Hämoglobin
- Clumps Count: Thrombozytenagglutinate (Moritz, 2000; Meyer, 2005)

2.6.2 Retikulozyten-Methode

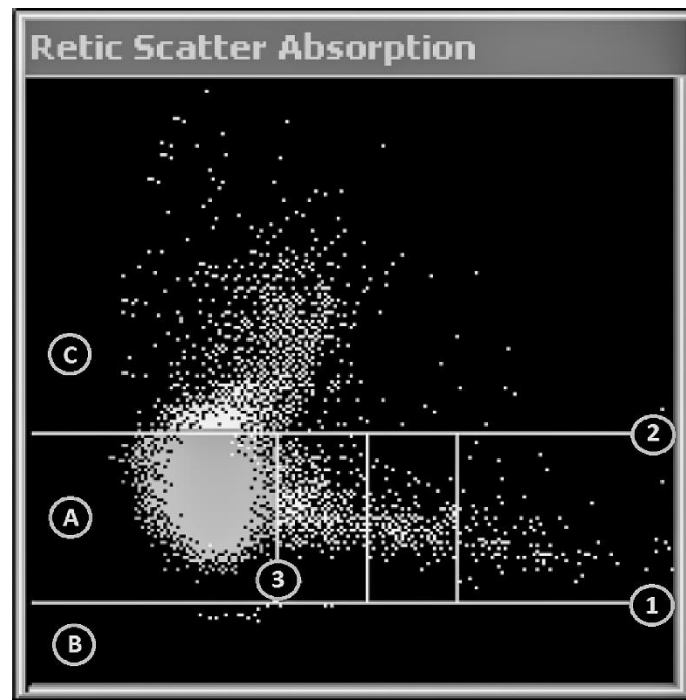
Der Probenanteil gelangt zunächst in die RETI-Reaktionskammer. Auch hier läuft die zytochemische Reaktion mit dem entsprechenden Reagenz in zwei Schritten ab. Zunächst werden die Erythrozyten durch ein zwitterionisches Netzmittel (Surfactant) ohne jegliche Volumenänderung aufgekugelt. Auch hier sind die Thrombozyten bereits durch das Antikoagulant EDTA aufgekugelt. Im nächsten Schritt färbt der kationische Farbstoff Oxazin 750, ein Neumethylenblauabkömmling, die in den Zellen enthaltene RNA an (Siemens, 2005). Die so vorbereitete Zellsuspension fließt jetzt durch die Flusszelle. Dabei ist sie vollständig von einem Mantelstrom umschlossen. Durch die so erreichte hydrodynamische Fokussierung passieren die Zellen einzeln den Laserstrahl. Wie bei der Erythrozyten- und Thrombozyten-Methode erfolgt die optische Messung bei 670 nm. Detektoren fangen das Vorwärtstreulicht im Niedrigwinkel (2 - 3°) und im Hochwinkel (5 - 15°) und zudem die Absorption jeder Zelle auf (Siemens, 2009).

Abbildung 9; Retikulozyten-Methode (Quelle: ADVIA 2120i/2120/120 Trainingshandbuch (Siemens, 2009), mit freundlicher Genehmigung von Siemens Healthcare Diagnostics): Detektoren erfassen das Niedrigwinkelsignal, das Hochwinkelsignal und die Absorption der einzelnen Zelle.



Der Hochwinkeldetektor gibt Aufschluss über die Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten und der Niedrigwinkeldetektor über das Volumen der beiden Zelltypen. Die Absorption liefert eine zum RNA-Gehalt proportionale Größe. Die drei Signale werden elektronisch verstärkt, sodass sich nun insgesamt sechs Signale ergeben: Das Niedrigwinkelstreulichtsignal wird 28-fach, das Großwinkelsignal 12-fach und das Absorptionssignal 33-fach verstärkt (Siemens, 2005). Die Trennung der adulten von den juvenilen Zellen wird durch die Kombination von Hochwinkelstreulichtsignal und Absorption möglich. Dies wird beim ADVIA 120/2120 zur Bestimmung der Retikulozyten genutzt. Hierbei wird im Reti-Streulicht-Abs-Zytogramm das niedrig verstärkte Hochwinkelstreulichtsignal (Zellgröße) auf der y-Achse und das hoch verstärkte Absorptionssignal (Zellreifung) auf der x-Achse aufgetragen (Abbildung 10). In diesem Zytogramm wird nun ein Schwellenwert eingesetzt, um die Erythrozyten (Abbildung 10, Punkt A) und Retikulozyten von der Thrombozytenpopulation (B) abzugrenzen (Abbildung 10, Punkt 1) (Siemens, 2005).

Abbildung 10; Retic Scatter Absorption (eigene Messung, nach Siemens, 2009: ADVIA 2120i/2120/120 Trainingshandbuch): Durch Schwellenwerte werden Erythrozyten (A), Thrombozyten (B), Koinzidenz-Ereignisse (C) und Retikulozyten voneinander abgegrenzt und Retikulozyten in verschiedene Reifungsgrade unterteilt.



Ein weiterer Schwellenwert (2) grenzt die Erythrozyten von Koinzidenz-Ereignissen ab (C). Die auf der x-Achse aufgetragene Absorption ist proportional zum RNA-Gehalt. Somit befinden sich Zellen mit höherer Absorption und folglich höherem RNA-Gehalt weiter rechts. In der Population der Erythrozyten stellen diese Zellen deren juvenile Stadien, die Retikulozyten, dar. Sie werden von den Erythrozyten abgegrenzt (3) und können sogar mithilfe zweier weiterer Schwellenwerte in drei Reifungsstadien eingeteilt werden (Siemens, 2005). Retikulozyten, die sich ganz rechts befinden, besitzen den höchsten RNA-Gehalt und sind demnach am jüngsten. Verfolgt man die x-Achse nach links, so nimmt der RNA-Gehalt ab und die Reifungsstufe zu. Das erlaubt die Subklassifikation der Retikulozyten in N-, M- und H-Retikulozyten (Siemens, 2009). Somit ergeben sich insgesamt folgende Parameter für die Beurteilung der Retikulozyten:

- RETIC count: absolute und relative Retikulozytenzahl ($10^9/l$, %)
- N-Retikulozyten mit niedriger Absorption, als prozentuale oder absolute Zahl (% , $10^9/l$); sie stellen die reifste Gruppe der Retikulozyten dar

- M-Retikulozyten mit mittlerer Absorption, als prozentuale oder absolute Zahl (% , $10^9/l$)
- H-Retikulozyten mit hoher Absorption, als prozentuale oder absolute Zahl (% , $10^9/l$); sie bezeichnen die juvenilsten Retikulozyten
- MCVr: mittleres Retikulozytenvolumen (fl)
- RDWr: Retikulozytenverteilungsbreite (%)
- CHCMr: mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten (g/dl)
- HDWr: Hämoglobinverteilungsbreite der Retikulozyten (g/dl) (Moritz et al., 2004; Moritz, 2000)

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv die Daten von 362 Hundeblutproben analysiert. Sie stammen von 348 Hunden sowie 14 Verlaufskontrollen. Die Proben wurden von Juli 2006 und April 2007 sowie von Juni 2009 bis Februar 2010 untersucht. Bei den Hunden handelt es sich zum einen um Patienten der Kliniken des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen. Hierbei wurden sowohl gesunde Patienten (z. B. im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung oder Blutspende) als auch kranke Tiere (zum Teil mit Verlaufskontrollen) miteinbezogen. Zum anderen stammen die Daten von gesunden Beagles aus dem Institut für Toxikologie, Merck Serono GmbH, Darmstadt, die im Rahmen einer Kontrolluntersuchung vor Studienbeginn hämatologisch untersucht wurden. Diese Studien erfolgten in Einklang mit den Arzneimittelprüfrichtlinien und dem Deutschen Tierschutzgesetz (Artikel 8) und wurden beim Regierungspräsidium Darmstadt angezeigt. Diese Beagle stammten vom Züchter Marshall (Marshall BioResources, USA) und waren zwischen zehn und vierzehn Monaten alt. 77 waren männlich und nicht kastriert, 76 Tiere weiblich und ebenfalls nicht kastriert. Die Haltung erfolgte für 20 Stunden pro Tag in Gruppen von 3 bis 5 Tieren und 4 Stunden pro Tag in Einzelhaltung in 6,54 m² großen Standard-Boxen mit Auslauf bei natürlicher Beleuchtung. Einmal täglich wurden die Hunde mit 300g eines pelletierten Futters der Marke Kliba (Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz) gefüttert. Trinkwasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Die gesamten Hunde waren gegen Staupe, Leptospirose, Parvovirose, Parainfluenza, Tollwut, Bordetella sowie Adenovirus geimpft und zudem entwurmt. Die 153 Hunde waren klinisch unauffällig.

Aus beiden Quellen ergab sich eine Datensammlung von 169 Proben kranker und 193 Proben gesunder Hunde. 175 Hunde waren männlichen und 173 Hunde weiblichen Geschlechts (männlich unkastriert n=144; männlich kastriert n=31, weiblich unkastriert n=120; weiblich kastriert n=53). Die Tiere waren zwischen 3 Monaten und 16 Jahren alt, wobei das Durchschnittsalter bei 4 Jahren lag (arithmetischer Mittelwert). 156 Hunde gehörten zur Rasse Beagle und 55 waren Mischlingshunde. Darauf folgten der Deutsche Schäferhund (n=14), Labrador Retriever (n=10), Golden Retriever (n=8), Berner Sennenhund (n=8), Border Collie (n=7) und mehrere andere Rassen (Afghane (n=1), Airedale Terrier (n=2), Alaskan Malamute (n=1), Altdeutscher Hütehund (n=1), American Pitbull Terrier (n=1), American Staffordshire

Terrier (n=1), Basset Hound (n=1), Berger de Pyrénées (n=1), Bernhardiner (n=1), Bordeaux Dogge (n=1), Bouvier de Flanders (n=1), Boxer (n=1), Briard (n=1), Bullmastiff (n=1), Cavalier King Charles Spaniel (n=1), Chihuahua (n=1), Cocker Spaniel (n=1), Collie (Langhaar) (n=1), Dachshund (n=2), Dalmatiner (n=3), Deutsch Drahthaar (n=1), Deutsch Kurzhaar (n=1), Deutsche Dogge (n=6), Dobermann (n=3), Englische Bulldogge (n=2), English Setter (n=1), Flat Coated Retriever (n=1), Fox Terrier (n=1), Groenendale (n=1), Großer Münsterländer (n=1), Hovawart (n=2), Husky (n=2), Jack Russel Terrier (n=4), kleiner Münsterländer (n=2), Leonberger (n=1), Malinois (n=1), Malteser (n=1), Mops (n=2), Neufundländer (n=1), Pekingnese (n=2), Pinscher (n=1), Pudeln (n=2), Rauhaardackel (n=5), Rehpinscher (n=1), Rhodesian Ridgeback (n=2), Riesenschnauzer (n=2), Schnauzer (n=2), Scottish Terrier (n=1), Sheltie (n=1), Shih Tzu (n=1), Wachtel (n=1), Weißer Schäferhund (n=1), Welsh Terrier (n=1), West Highland White Terrier (n=4), Wolfsspitz (n=1), Yorkshire Terrier (n=2), Zwergschnauzer (n=1), Zwergspitz (n=1)).

3.2 Blutentnahme

Das Blut wurde mit einer sterilen Einwegkanüle (0,9 x 40mm, Henke Sass Wol GmbH, Tuttlingen bzw. 19G, Terumo Deutschland GmbH, Eschborn) aus der Vena cephalica antebrachii, Vena saphena oder aus der Vena jugularis gewonnen. Daraufhin gelangte das Blut freilaufend in 1,3 ml, 5 ml bzw. 10 ml fassende K3-EDTA-antikoagulierende Röhrchen (Firma Sarstedt, Numbrecht). Die Messung der Blutproben erfolgte innerhalb von 6 Stunden nach Entnahme.

3.3 Blutzellzählung

3.3.1 Sysmex XT-2000iV

Die Messungen wurden mit dem Sysmex XT-2000iV und der „veterinary software version 00-8“ sowie „00-10“, jeweils unter der Einstellung *Hund* und der Testanforderung *CBC/DIFF/RET*

(kleines Blutbild, Differentialblutbild, Retikulozyten), durchgeführt. Hierbei misst das Gerät 80 Proben/Stunde und benötigt im Modus „Manual“ 85 µl Blutvolumen. Die Kalibration erfolgte durch Mitarbeiter der Firma Sysmex. An den Tagen der Analyse wurden Qualitätskontrollen entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.2 ADVIA 120/2120

Ein Teil der Messungen wurde mit dem ADVIA 2120 der Firma Siemens Healthcare Diagnostics und der Multispecies System Software V 5.3.1-MS und der andere Teil mit dem ADVIA 120, ausgestattet mit der Multispecies System Software V 3.1.8-MS, durchgeführt. Da die Geräte ADVIA 120 und 2120 bezüglich der hier relevanten Parameter mit derselben Methode arbeiten, erfolgte eine zusammengefasste Betrachtung ihrer Ergebnisse.

Die Geräte arbeiteten unter der Einstellung *Hund* und der Testanforderung *KLBB(CBC)/DIFF/RETI* (kleines Blutbild, Differentialblutbild, Retikulozyten). Hierbei betragen das Ansaugvolumen 175 µl im offenen Modus und der Durchsatz im gewählten Modus 74 Proben/Stunde. Der Hersteller Siemens führte die Kalibration der Geräte durch. Weiterhin wurden täglich Qualitätskontrollen mit vom Hersteller bezogenen Materialien durchgeführt.

3.4 Analyse

3.4.1 Sysmex XT-2000iV

Bei der Analyse der Dateien mithilfe der „veterinary software version 00-11“ wurden folgende Thrombozyten-Parameter inklusive der zugehörigen Parametermarkierungen ermittelt:

Parameter:

- PDW (fl)
- MPV(fl)
- P-LCR (%)
- PCT (%)
- PLT-I ($10^9/l$)
- PLT-O ($10^9/l$)

Parametermarkierungen:

- +, - : Daten außerhalb der Referenzintervalle
- @ : Daten außerhalb des Linearitätsbereichs
- * : Daten sind anzuzweifeln
- ----: keine Analyse

Sowie folgende flags:

- PLT Abn Distribution: abnormale Verteilung der Thrombozyten (bzgl. Morphologie)
- Thrombocytopenia: Thrombozytopenie
- Thrombocytosis: Thrombozytose
- PLT Abn Scattergram: abnormale Thrombozyten-Punktwolke (bzgl. Anzahl)

Ein Herausstellungsmerkmal des XT-2000iV der Firma Sysmex ist die benutzerfreundliche Reanalyse inklusive Gating direkt am Gerät. Die Software ermöglicht es, ein individuelles Gate zu generieren, dieses zu speichern und in dieser Einstellung anschließend automatisch den gewünschten Datensatz zu reanalysieren. Mithilfe der „veterinary software version 00-11“ wurde im Laufe dieser Arbeit zunächst ein Gate um die gesamte Population der Thrombozyten gelegt. Dann wurden verschiedene weitere Gates generiert, um die retikulierten Thrombozyten zu erfassen. Neben mehreren eigenen Gates orientierten wir uns bei zwei Gates an den Arbeiten von Pankraz et al. und Gelain et al. (Pankraz et al., 2009; Gelain et al., 2010a). Diese beiden Gates dienten als Referenzmethode bei der Beurteilung der Messung der retikulierten Thrombozyten mithilfe der anderen Sysmex-Gates sowie mithilfe des ADVIA 120/2120. Das hier als „Gelain“ bezeichnete Gate wurde sowohl von Pankraz et al. als auch von Gelain et al. beschrieben. Die von Pankraz et al. etablierte Methode der r-PLT-Messung bezog sich jedoch auf das hier als „Pankraz“ bezeichnete Gate (persönliche Mitteilung Dr. Alexander Pankraz).

Die Gefahr von klinisch bedeutsamen Interferenzen durch kleine Erythrozyten bestand, wenn das Gate 4 (s. Abbildung 11) über 5 % der insgesamt in Gate 1 und 4 gemessenen Events enthielt. In diesem Fall war eine Verfälschung der Gesamthrombozytenzahl zu befürchten. Dieser Verdacht wurde mittels visueller Überprüfung der Scattergramme verifiziert.

Abbildung 11; schematische Darstellung des PLT-O-Scattergramms mit dem Gate nach Gelain et al, FSC: Vorwärtsstreuung, SFL: Seitenfluoreszenz, RBC: Erythrozyten, LFR: Retikulozyten mit niedriger Fluoreszenz, MFR: Retikulozyten mit mittlerer Fluoreszenz, HFR: Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz, PLT: Thrombozyten, r-PLT: retikulierte Thrombozyten, Gate 4: Gate mit möglichen Interferenzen, grünes Gate: erfasst alle Thrombozyten nach Gelain et al., rotes Gate: erfasst r-PLT nach Gelain et al.

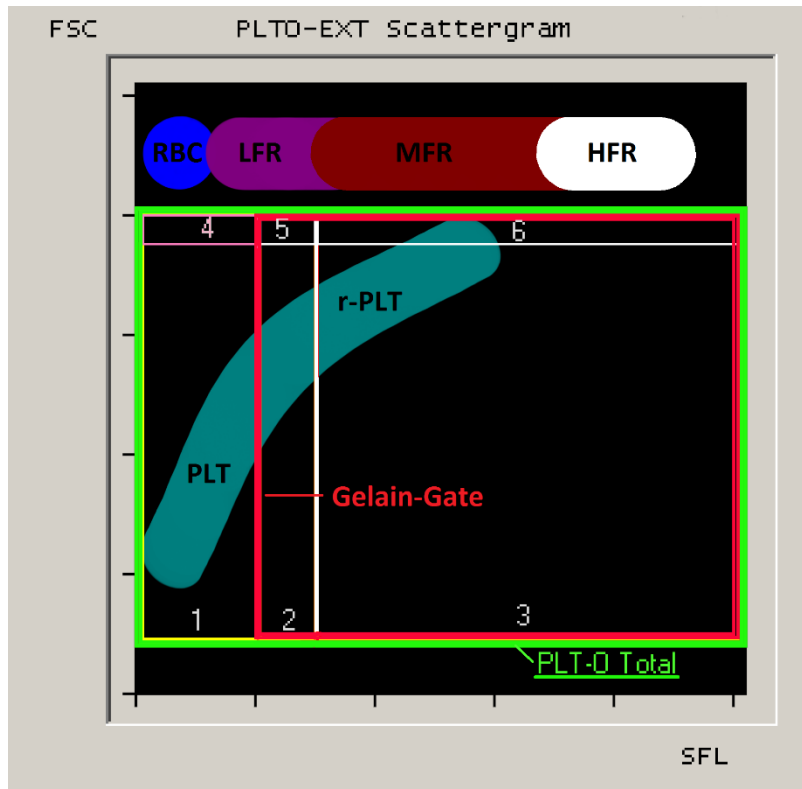


Abbildung 12; schematische Darstellung des PLT-O-Scattergramms mit dem Gate nach Pankraz et al., grünes Gate: erfasst alle Thrombozyten nach Pankraz et al., rotes Gate: erfasst r-PLT nach Pankraz et al.

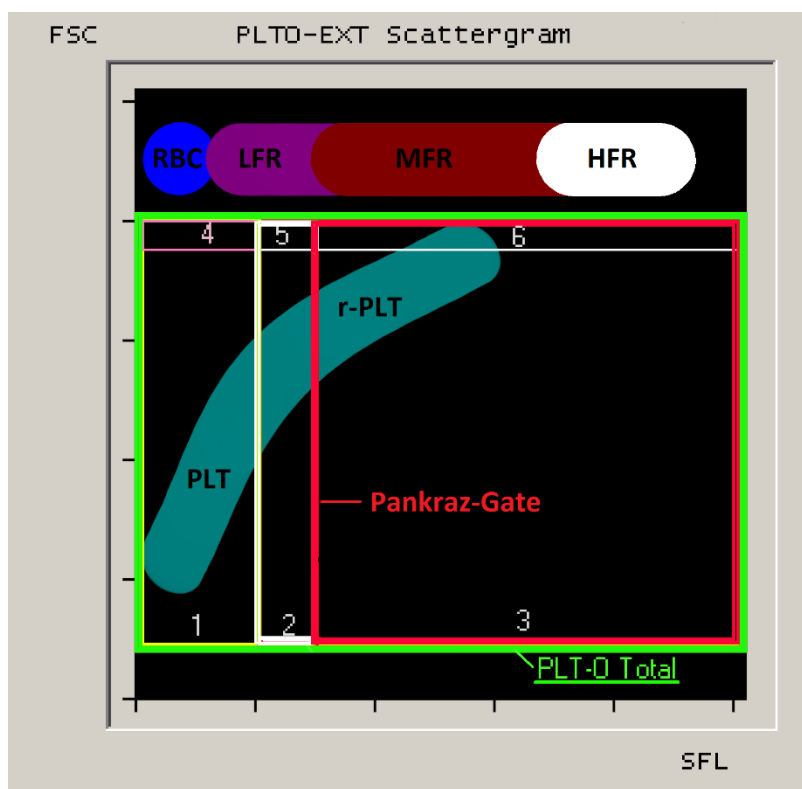


Abbildung 13; schematische Darstellung des PLT-O-Scattergramms mit dem Gate nach Oellers et al., grünes Gate: erfasst alle Thrombozyten nach Oellers et al., rotes Gate: erfasst r-PLT nach Oellers et al.

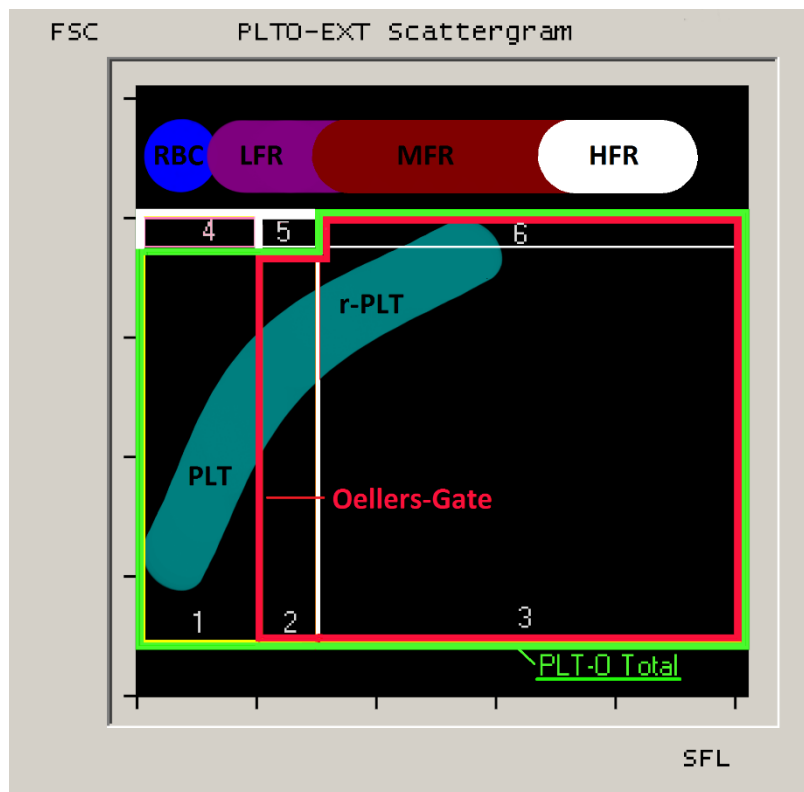


Abbildung 14; schematische Darstellung verschiedener XT-2000iV-Gates anhand repräsentativer Scattergramme eines gesunden Hundes (links) und eines Hundes mit erhöhter r-PLT-Nachbildung (rechts)

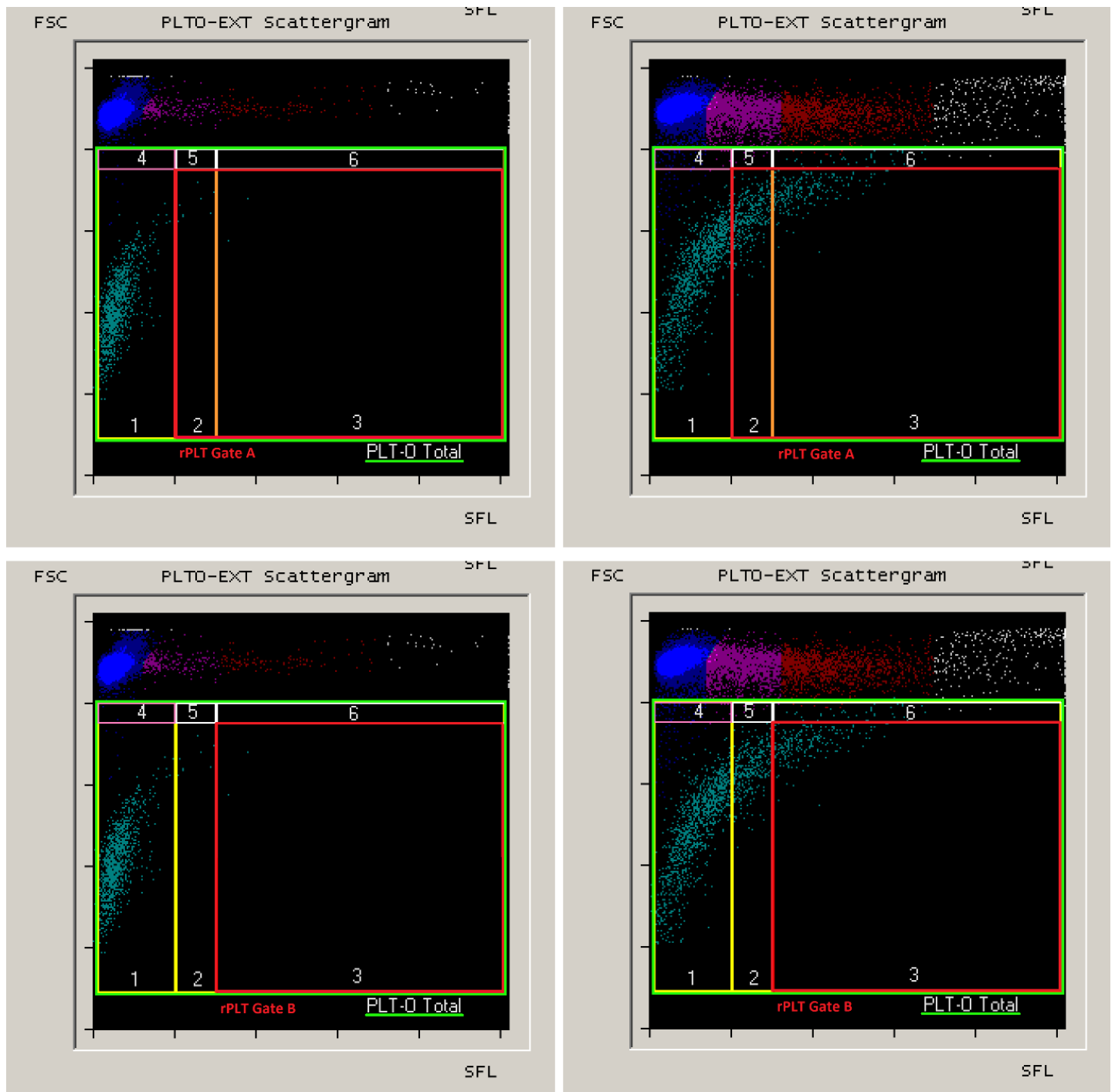


Abbildung 15; schematische Darstellung verschiedener XT-2000iV-Gates anhand repräsentativer Scattergramme eines gesunden Hundes (links) und eines Hundes mit erhöhter r-PLT-Nachbildung (rechts), dargestellt sind die Gates nach Gelain et al. und Pankraz et al.

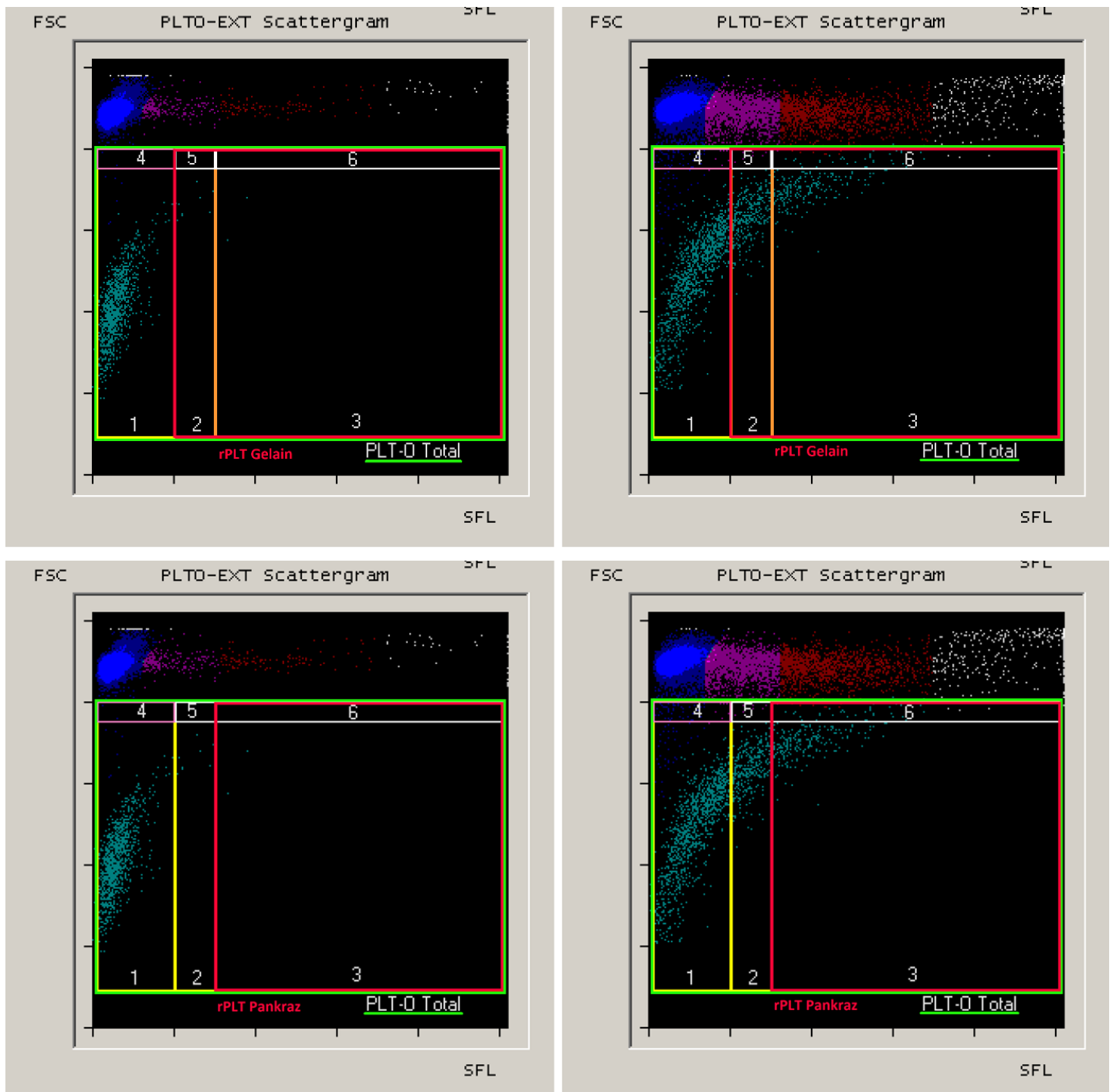
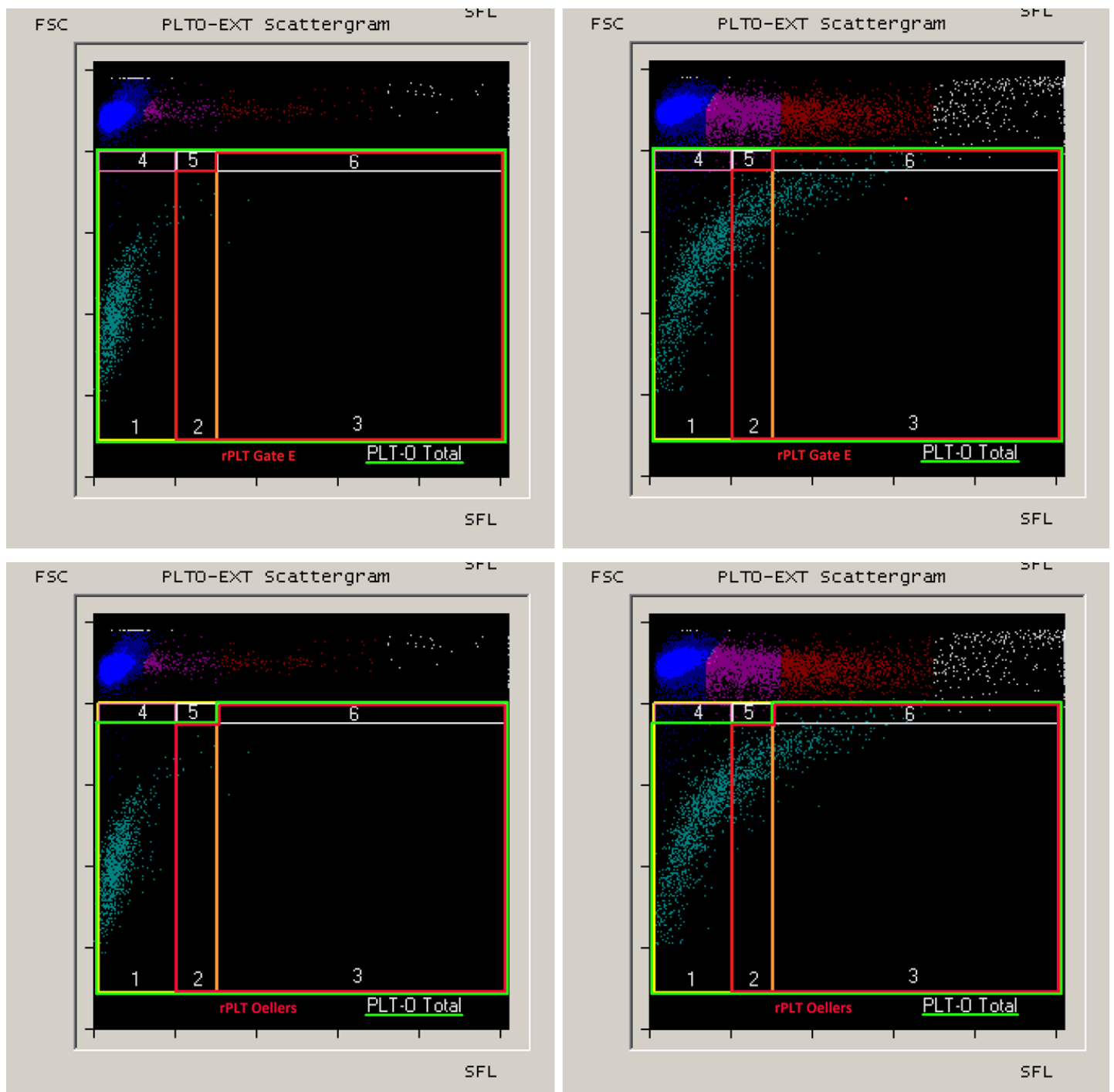


Abbildung 16; schematische Darstellung verschiedener XT-2000iV-Gates anhand repräsentativer Scattergramme eines gesunden Hundes (links) und eines Hundes mit erhöhter r-PLT-Nachbildung (rechts), darunter das Gate nach Oellers et al.



3.4.2 ADVIA 120/2120

Die Rohdaten der wie oben beschrieben gemessenen Proben wurden gespeichert und für diese Arbeit reanalysiert. Dies erfolgte mit der aktuellen Multispecies System Software V 5.9.0-MS. Folgende für diese Arbeit relevante Parameter wurden dabei gewonnen:

- PLT ($\times 10^3$ cells/ μ l)
- MPV (fl)
- PDW (%)
- PCT (%)
- Large_PLT ($\times 10^3$ cells/ μ l)
- MPC (g/dl)
- PCDW (g/dl)
- MPM (pg)
- PMDW (pg)
- # PLT Clumps
- % PLT Clumps
- RBC_Fragments ($\times 10^6$ cells/ μ l)
- RBC_Ghosts ($\times 10^6$ cells/ μ l)

Zudem wurden die fcs-Rohdateien des RETIC-Kanals generiert und mit der Software WinMDI Version 2.9 (für Windows, The Scripps Research Institute, La Jolla California USA, <http://facs.scripps.edu/software.html>) zur Bestimmung der retikulierten Thrombozyten analysiert. Hierbei wurde zunächst ein Gate um die gesamte Population der Thrombozyten gelegt, um Erythrozyten, Retikulozyten und Debris auszuschließen. Dann wurde nach morphologischer Prüfung zahlreicher Scattergramme ein Gate gewählt, das den Großteil der adulten Thrombozyten ausschließt und eine Population von Zellen beinhaltet, deren morphologisches Muster dem der retikulierten Thrombozyten gleicht. Nachfolgend wurde dieses Gate in mehrere Gates unterteilt, welche Thrombozyten unterschiedlicher Absorption

einbeziehen. Das am besten geeignete Gate wurde anschließend ausgewählt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen typische Scattergramme einer normalen Probe und einer Probe mit erhöhter r-PLT-Zahl. Erythrozyten und Retikulozyten sind hierbei rot dargestellt. Reife Thrombozyten erscheinen grün. Rechts davon sind retikulierte Thrombozyten in verschiedenen Gates zu sehen.

Abbildung 17; Darstellung des ADVIA-r-PLT-Gates bei einem gesunden Hund, rot: Erythrozyten mit Retikulozyten, grün: adulte Thrombozyten, blau: r-PLT, x-Achse: Absorption, y-Achse: Zellgröße; rechts neben der grünen Punktwolke befinden sich die verschiedenen getesteten r-PLT-Gates

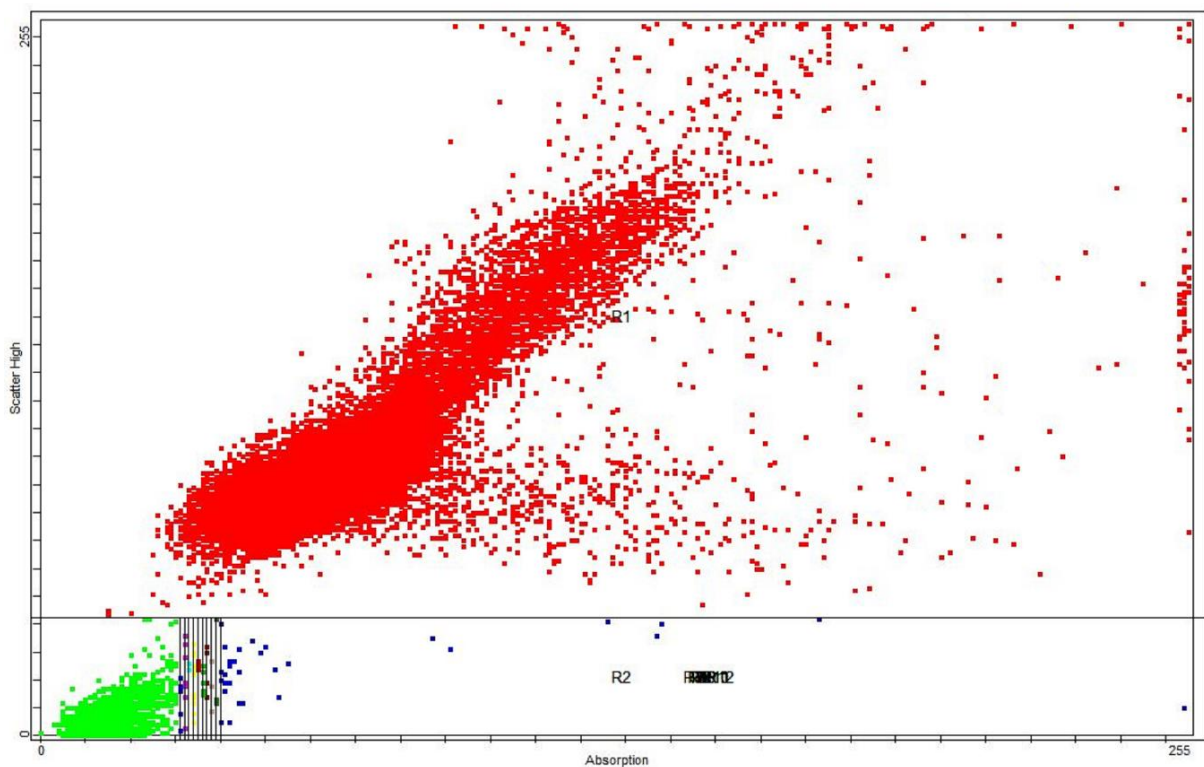
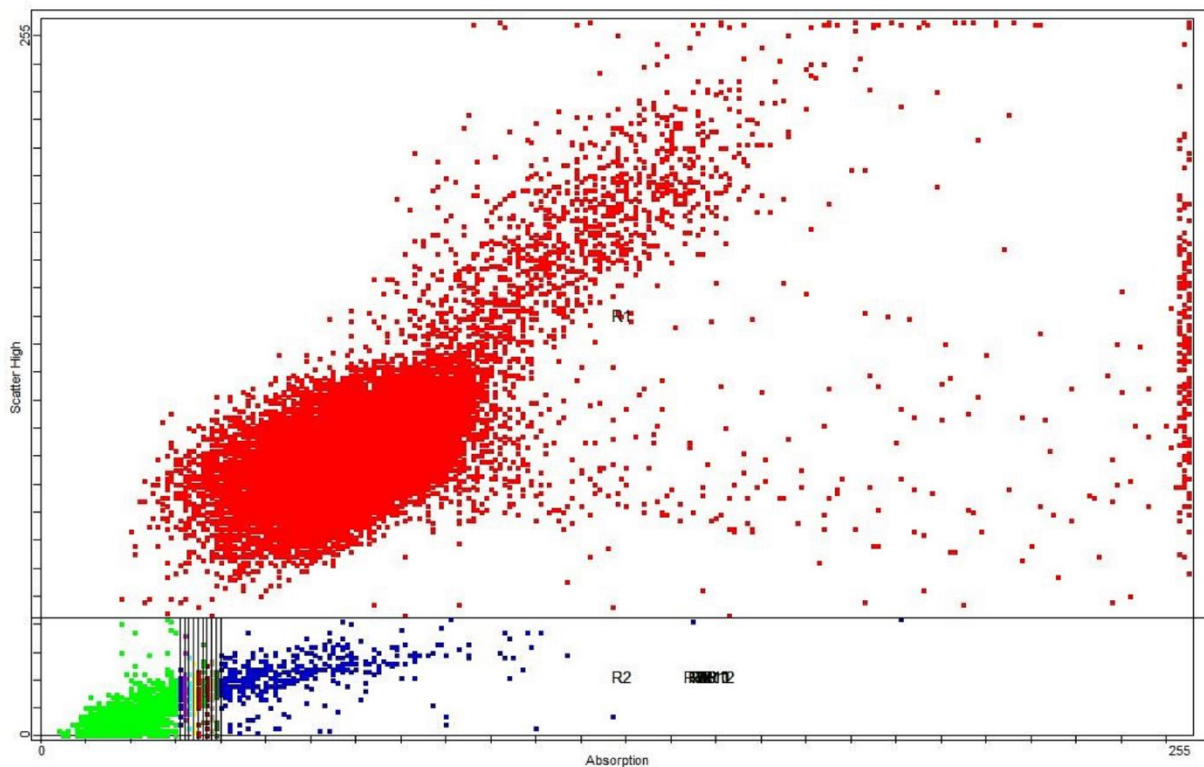


Abbildung 18; Darstellung des ADVIA-r-PLT-Gates bei einem Hund mit erhöhter r-PLT-Zahl, rot: Erythrozyten mit Retikulozyten, grün: adulte Thrombozyten, blau: r-PLT, x-Achse: Absorption, y-Achse: Zellgröße



3.5 Statistik

Die gemessenen Daten sowie Angaben zu Alter, Geschlecht und Rasse wurden in eine Excel-Tabelle übertragen. Die statistische Auswertung erfolgte außerdem bei Gewinnung der Referenzwerte mit der Software „Reference Value Adviser“ Version 2.1 für Microsoft Excel und bei dem Methodenvergleich mit dem Statistikprogramm „Analyse-it“ Version 2.04 für Microsoft Excel. Die Receiver-Operating-Characteristic-Kurven wurden mit der Software „MedCalc“ Version 12.7.5.0 erstellt. Bei der Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gates zur r-PLT-Messung wurde das Programm „GraphPad Prism“ Version 6 verwendet. Es wurde der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt und die p-Werte für multiple Vergleiche adaptiert.

3.5.1 Präzision

Die Präzision wurde nach dem CV (Variationskoeffizienten) bewertet. Es wurden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet. Hierfür wurden beim Sysmex XT-2000iV 25 Messungen derselben Blutprobe beurteilt. Dabei markierte der XT-2000iV die Parameter MPV, PCT, P-LCR und PDW mehrerer Messungen und gab hier keine Werte an. Somit wurden für diese Parameter nur 7 Werte in die Berechnung mit einbezogen. Bei der Beurteilung der Präzision des ADVIA 120/2120 wurden 22 Messungen einer Blutprobe beurteilt.

3.5.2 Methodenvergleich

Die Messergebnisse der retikulierten Thrombozyten wurden mithilfe des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten, der Bland-Altman-Analyse und der Passing-Bablok-Analyse ausgewertet. Hierbei dienten die von Pankraz et al. und Gelain et al. beschriebenen Methoden zur Messung der retikulierten Thrombozyten mithilfe des Sysmex XT-2000iV als Referenzmethode. Darüber hinaus wurde zur Bewertung der ADVIA-Methode das Gate nach Oellers et al., das ein verbessertes „Gelain-Gate“ darstellt, als Referenzmethode herangezogen. Auch der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenindizes wurde anhand des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten bewertet.

Ergibt sich für den nach Spearman berechneten Korrelationskoeffizienten (spearman's rank correlation coefficient (r_s)) ein Wert von 1, korrelieren beide Methoden vollständig. Die Bland-Altman-Analyse lieferte den Mittelwert der Differenz zwischen beiden Methoden („bias“) mit den Grenzen der Übereinstimmung („95% limits of agreement“). Y-Achsenabschnitt („y-intercept“) und Steigung („slope“) mit 95%igem Konfidenzintervall wurden mittels Passing-Bablok-Analyse ermittelt. Diese Ergebnisse werden zum einen in einem Punktwolkendiagramm dargestellt, das darüber hinaus die mittels Passing-Bablok-Analyse ermittelte Hauptkomponentengerade enthält. Zum anderen wird die Bland-Altman-Analyse graphisch dargestellt. Beim Bland-Altman-Diagramm werden die Differenzen der beiden Methoden gegen den Mittelwert beider Methoden als Punktwolkendiagramm aufgetragen. Zusätzlich kennzeichnen horizontale Geraden die Grenzen der Übereinstimmung („limits of

agreement“). Sie entsprechen dem Mittelwert der Differenz + und – 1.96 x Standardabweichung der Differenz. Der Mittelwert der Differenz zwischen beiden Methoden („bias“) gibt den systematischen Fehler des zu testenden Geräts an. So wird deutlich, um welchen Wert die Ergebnisse des ADVIA 120/2120 höher oder niedriger im Vergleich zum XT-2000iV sind.

Nachfolgend wurden für den Vergleich zwischen den Messungen der retikulierten Thrombozyten mithilfe des Sysmex XT-2000iV und mithilfe des ADVIA 120/2120 Grenzwertoptimierungskurven (Receiver-Operating-Characteristic-Kurven, ROC-Kurven) erstellt. Die ROC-Kurven-Analyse erlaubt Rückschlüsse darauf, ob der ADVIA 120/2120 in der Lage ist, eine Erhöhung des Anteils der retikulierten Thrombozyten richtig zu erkennen. Entscheidend hierbei sind Sensitivität, Spezifität und Cut-Off-Wert. Die Sensitivität ist die Fähigkeit der Methode, die nach der Referenzmethode positiven Proben ebenfalls als solche zu erkennen. Es wird der Anteil der korrekt als positiv erkannten Proben, bezogen auf die tatsächlich positiven Proben, in Prozent angegeben. Die Spezifität gibt den Anteil der korrekt als negativ erkannten Proben, bezogen auf die Gesamtheit der tatsächlich negativen Proben (nach Referenzmethode), an. In der ROC-Kurve sind sowohl Sensitivität als auch Falsch-Positiv-Rate für den betreffenden Cut-Off-Wert eingetragen. Existiert für die beurteilte Methode keinerlei Trennschärfe, sondern handelt es sich stattdessen eher um einen Zufallsprozess, gleicht die ROC-Kurve einer Diagonalen. Weist die Methode jedoch eine hohe Sensitivität und Spezifität, d.h. eine große Trennschärfe, auf, bewegt sich die Kurve in die obere linke Ecke des Diagramms und unterscheidet sich deutlich von einer Diagonalen. Dabei nimmt die Fläche unter der Kurve zu. Diese AUC (area under the curve) spiegelt die Güte der Methode wieder. Sie nimmt Werte zwischen 0,5 und 1 an, wobei ein Wert von 0,5 das schlechteste Ergebnis und ein Wert von 1 das Optimum ist.

Außerdem wurde geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden besteht. Es wurde der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt und die p-Werte für multiple Vergleiche adaptiert. Zur Beurteilung der Signifikanz wird der p-Wert angegeben. Für $p \leq 0,05$ wird das Ergebnis als signifikant bezeichnet.

Auch werden der Medianwert sowie Maximum und Minimum (Range) angegeben.

3.5.3 Referenzintervalle

Die Referenzwerte wurden mit „Reference Value Adviser Version 2.1“ für Microsoft Excel ermittelt und für verschiedene Gruppen gesunder Hunde der untersuchten Population angegeben. Eine Gruppe beinhaltet die gesamten gesunden Hunde ($n = 193$), d.h. die einheitlich gehaltenen Beagle und die gesunden Hunde verschiedener Rassen. Außerdem werden die Referenzwerte separat zum einen für die Gruppe der gesunden Beagle ($n = 153$) und zum anderen für die Gruppe der gesunden Hunde anderer Rassen ($n = 40$) angegeben. Für die ersten beiden Gruppen ist laut der Richtlinien der ASVCP (American Society of Veterinary Clinical Pathology) die Anzahl der Proben ausreichend groß ($n \geq 120$) um zur Berechnung der Referenzwerte die nichtparametrische Methode anzuwenden (Friedrichs et al., 2011). Die Gruppe gesunder Hunde anderer Rassen umfasst 40 Hunde. Auch hier kann die nichtparametrische Methode angewandt werden. Empfohlen wird die robuste Methode für Probenzahlen von $40 \leq x \leq 120$. Sie erfordert keine Normal-Verteilung nach Gauß, jedoch eine symmetrische Verteilung der Daten. Liegt diese nicht vor, wird sie mittels Box-Cox-Transformation erreicht. Liegt auch nach Transformation keine Symmetrie vor, wird zusätzlich zur nichtparametrischen Methode die parametrische Methode angewandt, wenn die Werte eine Normalverteilung nach Gauß aufweisen oder diese durch Transformation erreicht wurde. Innerhalb der Gruppe der gesunden Hunde anderer Rassen existieren für einige Parameter keine 40 Messwerte, da der Sysmex XT-2000iV bei einigen Proben keine Werte zu den Thrombozytenparametern MPC, PDW, P-LCR und PCT ausgibt. Für diese Probenanzahl ($20 \leq x < 40$) wird die robuste oder bei Normalverteilung die parametrische Methode empfohlen (Friedrichs et al., 2011). Bei jeder Gruppe werden 95 % der untersuchten Population in die Berechnung eingeschlossen. Das 90%-Konfidenzintervall der hier angegebenen Referenzintervalle wurde mit der nichtparametrischen Bootstrap-Methode ermittelt.

4 Ergebnisse

In den nachfolgenden Kapiteln werden zunächst die Präzision, der Methodenvergleich und nachfolgend die ermittelten Referenzwerte für retikulierte Thrombozyten und Thrombozytenindizes angeführt. ADVIA 120 und 2120 arbeiten bezüglich der hier relevanten Parameter mit derselben Analysemethode, die bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde. Daher werden die Ergebnisse dieser beiden Geräte in der vorliegenden Arbeit gemeinsam betrachtet. Die in Bezug auf den Methodenvergleich genutzte Referenzmethode ist die Messung der retikulierten Thrombozyten mithilfe des Sysmex XT-2000iV nach den Methoden von Pankraz et al. und Gelain et al. sowie die Methode nach Oellers et al. als Optimierung der Methode nach Gelain et al. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Beziehung zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern angegeben. Abschließend folgen die ermittelten Referenzwerte.

4.1 Präzision

Die Ermittlung der Präzision innerhalb der Serie erfolgte in dieser Arbeit für jedes Gerät durch die retrospektive Auswertung mehrerer Messungen derselben Probe. Für den ADVIA 120/2120 wurden 22 Messungen ausgewertet, während es beim XT-2000iV 25 Messungen waren. Für die Parameter MPV, PCT, P-LCR und PDW gab der XT-2000iV jedoch nur 7 Werte an, sodass hier weniger Werte für die Berechnung des Variationskoeffizienten zur Verfügung standen. Für jeden Parameter werden der Mittelwert mit Standardabweichung und der Variationskoeffizient angegeben.

4.1.1 Präzision ADVIA 120/2120

Tabelle 1; Präzision des ADVIA 120/2120, n=1, 22-fache Messung

Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
r-PLT ADVIA	%	$0,73 \pm 0,26$	35,64
r-PLT ADVIA	$10^9/l$	$1,78 \pm 0,66$	36,97
PLT	$10^9/l$	$318,45 \pm 21,97$	6,90
MPV	fl	$11,16 \pm 0,61$	5,49
PDW	%	$57,56 \pm 2,38$	4,14
PCT	%	$0,35 \pm 0,03$	7,32
MPC	g/dl	$21,17 \pm 0,80$	3,77
PCDW	g/dl	$6,92 \pm 0,40$	5,79
MPM	pg	$2,07 \pm 0,02$	1,03
PMDW	pg	$0,78 \pm 0,02$	2,85
Large PLTs	$10^9/l$	$24,36 \pm 6,22$	25,54
RBC Ghosts	$10^{12}/l$	$0,03 \pm 0,01$	29,50
RBC Fragments	$10^{12}/l$	$0,03 \pm 0,00$	17,78
% PLT Clumps	%	$12,37 \pm 52,97$	428,31
# PLT Clumps	Number (Events)	$2022,36 \pm 9270,91$	458,42

Die Variationskoeffizienten der Thrombozytenzahl und –indizes MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM, PMDW befinden sich in einem Bereich von 1,03 bis 7,32 %, während für die übrigen Parameter inklusive r-PLT-Messung hohe bis sehr hohe Werte zwischen 17,78 und 458,42 % ermittelt wurden.

4.1.2 Präzision Sysmex XT-2000iV

Tabelle 2; Präzision des Sysmex XT-2000iV, n=1, 25-fache Messung bzw. 7-fache Messung bei MPV, PCT, P-LCR und PDW

Parameter	Einheit	Mittelwert ± Standardabweichung $\bar{x} \pm S$	Variationskoeffizient CV (%)
r-PLT XT „Gelain“	%	$6,98 \pm 1,54$	22,02
r-PLT XT „Pankraz“	%	$1,81 \pm 0,75$	41,14
r-PLT XT „Oellers“	%	$7,02 \pm 1,55$	22,04
r-PLT XT „Gelain“	$10^9/l$	$7,11 \pm 1,52$	21,36
r-PLT XT „Pankraz“	$10^9/l$	$1,84 \pm 0,74$	40,10
r-PLT XT „Oellers“	$10^9/l$	$7,1 \pm 1,52$	21,38
MPV	fl	$13,2 \pm 0,24$	1,86
PCT	%	$0,17 \pm 0,01$	4,52
P-LCR	%	$47,7 \pm 1,30$	2,72
PDW	fl	$17,77 \pm 1,20$	6,75
PLT-I	$10^9/l$	$128,32 \pm 3,83$	2,98
PLT-O	$10^9/l$	$121,2 \pm 6,73$	5,56

Die Variationskoeffizienten der r-PLT-Messung fallen auch beim XT-2000iV mit Werten zwischen 21,36 und 41,14 % hoch aus, während sich die Werte der übrigen Thrombozytenindizes in einem moderaten Bereich zwischen 1,86 und 6,75 % befinden.

4.2 Methodenvergleich

Die Abbildungen der statistischen Auswertung werden hier nur zum Teil gezeigt. Alle weiteren Darstellungen befinden sich auf der beigefügten CD.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs dargestellt. Als Referenzmethode gelten hierbei die Messungen der retikulierten Thrombozyten mithilfe der XT-2000iV-Gates nach Pankraz et al. und Gelain et al. Bei der Beurteilung der r-PLT-Messung des ADVIA 120/2120 dient außerdem das optimierte Gelain-Gate, das Gate nach Oellers et al., als Referenzmethode. Es erfolgt die Überprüfung der Richtigkeit und des systematischen Fehlers der hier beurteilten neuen Methoden. Darunter sind zum einen die r-PLT-Messung mit dem neuen Gate am XT-2000iV und die Messung mit dem ADVIA 120/2120 zu verstehen. Bei beiden Geräten wurden zahlreiche neue Gates generiert, überprüft und anhand ihrer morphologischen Eignung beurteilt. Das jeweils Beste des XT-2000iV und des ADVIA 120/2120 wurde ausgewählt und die Ergebnisse in diesem Kapitel dargestellt.

4.2.1 Spearman-Korrelation, Passing-Bablok-Regression und Bland-Altman-Analyse

Im diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Spearman-Korrelation, der Passing-Bablok-Regression und der Bland-Altman-Analyse gezeigt. Der Korrelationskoeffizient wurde anhand der Spearman-Korrelation errechnet. Steigung („slope“) und y-Achsenabschnitt („intercept“) stammen aus der Passing-Bablok-Regression und werden mit 95%-Konfidenzintervall (95% CI) angegeben. Anschließend wird aus der Bland-Altman-Analyse die mittlere Abweichung („bias“) mit 95%-Übereinstimmungsgrenze aufgeführt. Die erste Tabelle bezieht sich auf den Methodenvergleich der Gates des XT-2000iV untereinander (siehe Tabelle 3). In der zweiten Tabelle sind die Ergebnisse des Methodenvergleichs zwischen XT-2000iV und ADVIA 120/2120 zu sehen (siehe Tabelle 4). Hierbei wird als Referenzmethode die r-PLT-Messung mit dem Sysmex-Gerät definiert.

Tabelle 3; Methodenvergleich: relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates zueinander, r_s = Spearman Korrelationskoeffizient, y-Achsenabschnitt und Steigung aus Passing-Bablok-Regression, mittlere Abweichung aus Bland-Altman-Analyse, n = 362

Parameter	Einheit	r_s	Steigung (95% CI)	y-Achsen- abschnitt (95% CI)	Mittlere Abweichung (95% Übereinstimmungsgrenze)
r-PLT XT „Gelain“ vs. r-PLT XT A	%	0,99	0,97 (0,95 bis 0,97)	-0,01 (-0,02 bis 0,00)	-0,1 (-1,8 bis 1,6)
r-PLT XT „Gelain“ vs. r-PLT XT „Oellers“	%	1,00	1,01 (1,01 bis 1,01)	0,00 (0,00 bis 0,00)	0,1 (-1,3 bis 1,6)
r-PLT XT „Pankraz“ vs. r-PLT XT A	%	0,86	2,81 (2,67 bis 2,98)	0,13 (0,07 bis 0,20)	1,9 (-4,0 bis 7,7)
r-PLT XT „Pankraz“ vs. r-PLT XT „Gelain“	%	0,89	2,83 (2,70 bis 2,99)	0,18 (0,12 bis 0,23)	2,0 (-4,3 bis 8,3)
r-PLT XT „Pankraz“ vs. r-PLT XT „Oellers“	%	0,88	2,92 (2,78 bis 3,11)	0,17 (0,10 bis 0,22)	2,1 (-4,9 bis 9,2)

Abbildung 19; Passing-Bablok-Regression für den Parameter r-PLT (%), Vergleich XT-2000iV-Gate "Pankraz" mit XT-2000iV-Gate "Oellers", n = 362

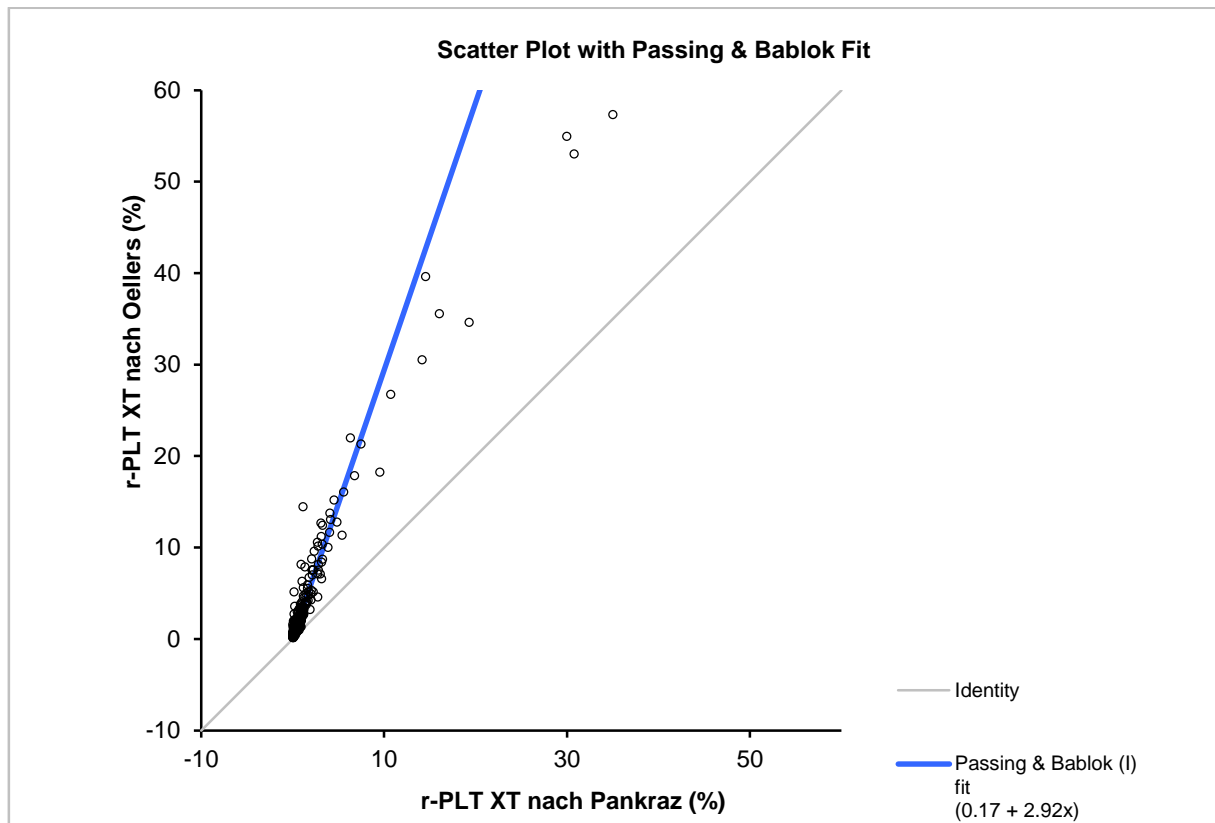
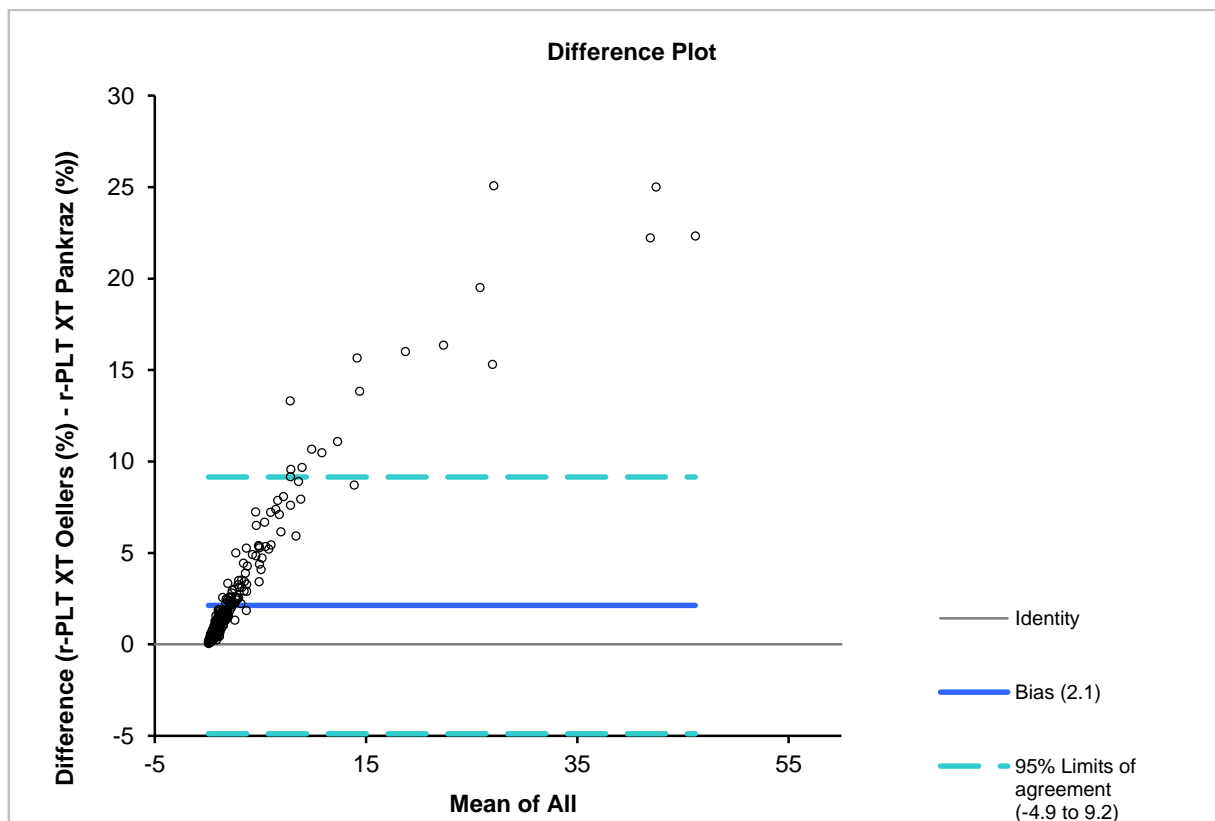


Abbildung 20; Altman-Bland-Diagramm für den Parameter r-PLT (%), Vergleich XT-2000iV-Gate "Pankraz" mit XT-2000iV-Gate "Oellers", n = 362



Der Vergleich der r-PLT-Messung des XT-2000iV mit unterschiedlichen Gates ergab sehr hohe Korrelationskoeffizienten. Eine erhöhte mittlere Abweichung („bias“) fällt lediglich bei dem Methodenvergleich des Gates nach Pankraz et al. mit den anderen Gates auf.

Tabelle 4; Methodenvergleich: relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates zu den r-PLT-Werten des ADVIA 120/2120, r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient, y-Achsenabschnitt und Steigung aus Passing-Bablok-Regression, mittlere Abweichung aus Bland-Altman-Analyse, n = 362

Parameter	Einheit	r_s	Steigung (95% CI)	y-Achsen- abschnitt (95% CI)	Mittlere Abweichung (95% Übereinstimmungsgrenze)
r-PLT XT A vs. r-PLT ADVIA	%	0,60	0,69 (0,61 bis 0,79)	0,36 (0,26 bis 0,48)	-0,3 (-7,0 bis 6,3)
r-PLT XT „Gelain“ vs. r-PLT ADVIA	%	0,60	0,68 (0,59 bis 0,77)	0,36 (0,26 bis 0,46)	-0,5 (-7,4 bis 6,4)
r-PLT XT „Pankraz“ vs. r-PLT ADVIA	%	0,55	2,42 (2,00 bis 3,03)	0,31 (0,14 bis 0,42)	1,5 (-4,7 bis 7,7)
r-PLT XT „Oellers“ vs. r-PLT ADVIA	%	0,60	0,62 (0,55 bis 0,70)	0,39 (0,29 bis 0,49)	-0,6 (-7,8 bis 6,6)

Abbildung 21; Passing-Bablok-Regression für den Parameter r-PLT (%), Vergleich XT-2000iV Gate "Gelain" mit ADVIA 120/2120, n = 362

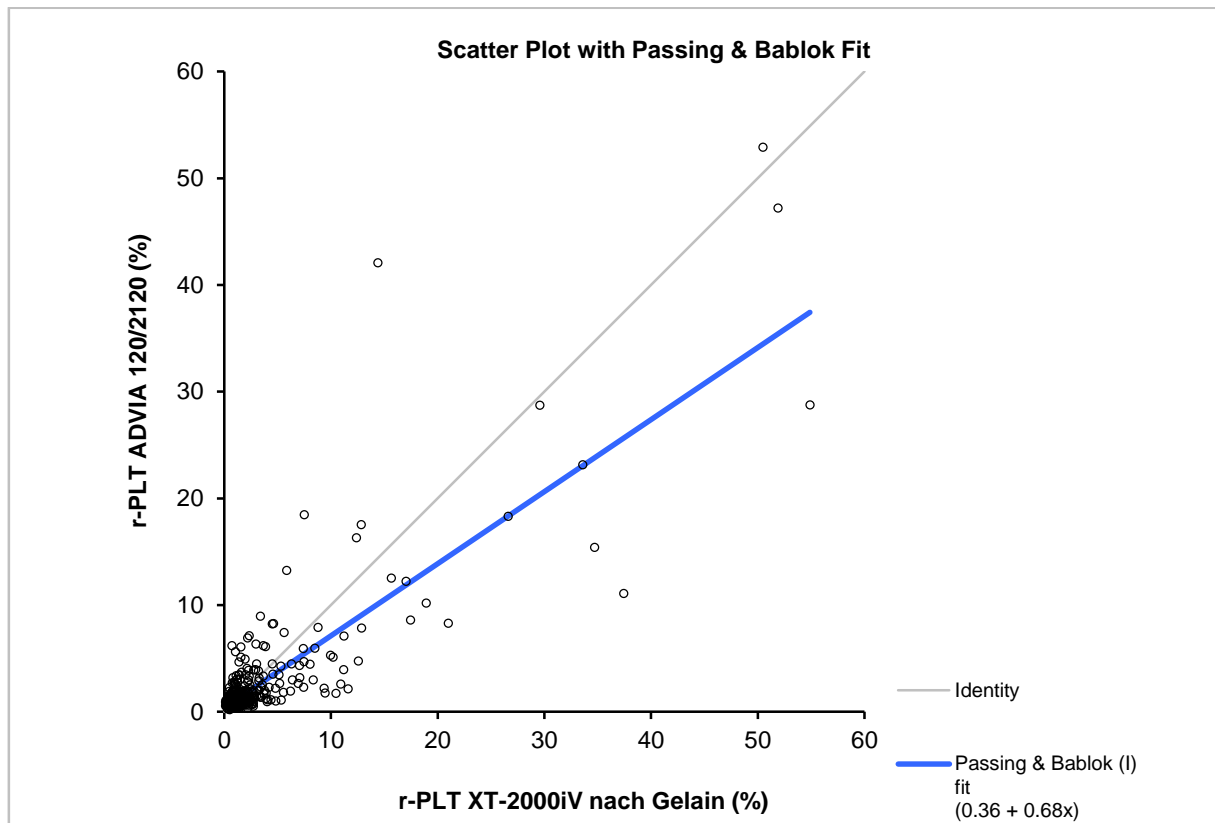
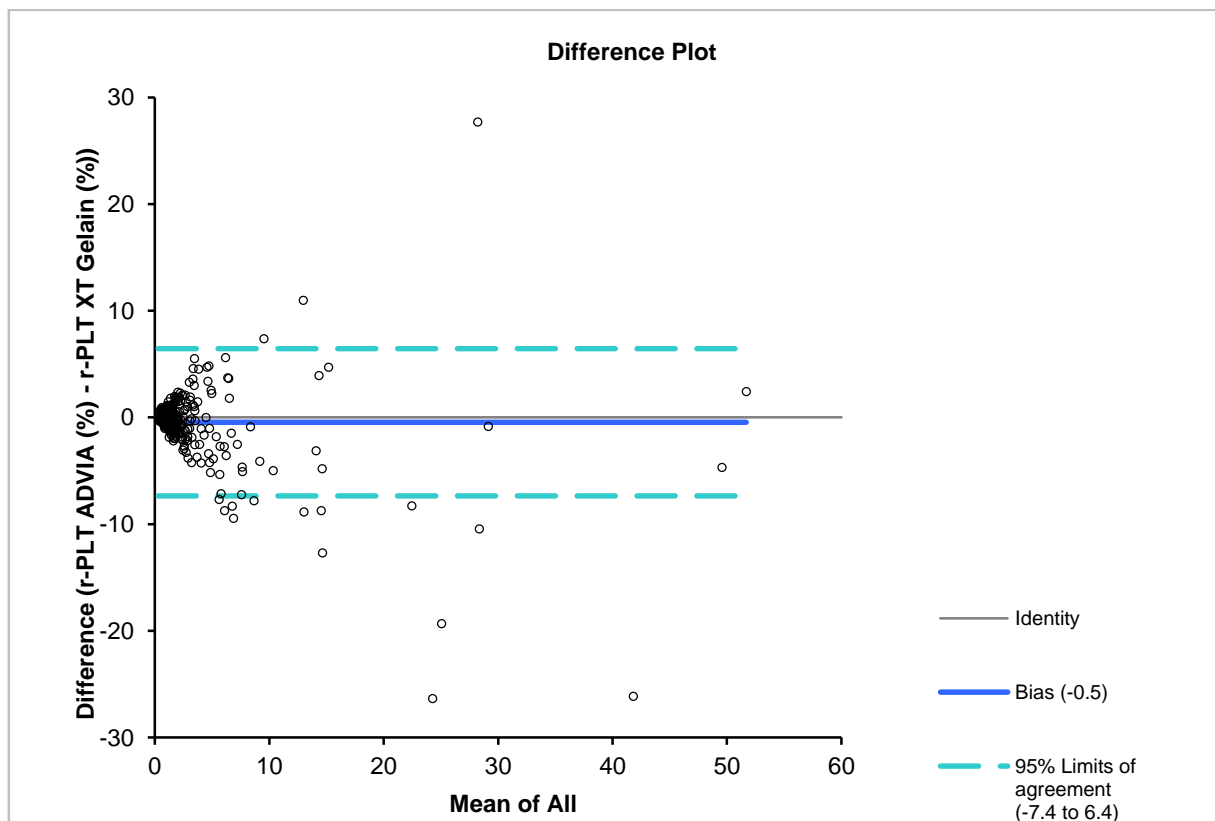


Abbildung 22; Altman-Bland-Diagramm für den Parameter r-PLT (%), Vergleich XT-2000iV Gate "Gelain" mit ADVIA 120/2120, n = 362



Für den Methodenvergleich der r-PLT-Messung beider Geräte miteinander wurden niedrige Korrelationskoeffizienten ermittelt. Der Vergleich der Gates A, „Gelain“ und „Oellers“ mit der Messung des ADVIA 120/2120 ergibt einen etwas besseren Korrelationskoeffizienten von 0,60, während er für das Gate „Pankraz“ als Referenzmethode einen Wert von 0,55 annimmt.

4.2.2 Überprüfung auf signifikante Unterschiede

Im weiteren Verlauf des Methodenvergleichs wurde geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den zur r-PLT-Bestimmung eingesetzten Methoden besteht. Hierzu werden die p-Werte angegeben, die für multiple Vergleiche adaptiert wurden. Ist der p-Wert $> 0,05$, so ist der Unterschied zwischen den Methoden als nicht signifikant definiert. Es werden außerdem die für die untersuchte Population errechneten Mittelwerte sowie das Minimum und Maximum (Range) angegeben.

Tabelle 5; Medianwert und Range (Minimum, Maximum) für die relativen r-PLT-Werte, alle Hunde, n = 362

Parameter	Einheit	Median	Minimum	Maximum
r-PLT XT „Gelain“	%	1,33	0,11	54,89
r-PLT XT „Pankraz“	%	0,40	0,0	35,02
r-PLT XT „Oellers“	%	1,33	0,12	57,34
r-PLT ADVIA	%	1,28	0,18	52,90

Median und Range des ADVIA 120/2120 befinden sich in einem ähnlichen Bereich wie die Werte der Gates nach Gelain et al. und Oellers et al. Ein deutlicher Unterschied zum Gate nach Pankraz et al. ist ersichtlich.

Tabelle 6; Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Methoden der r-PLT-Messung

Parameter	Einheit	Signifikanz	Angepasster p-Wert
r-PLT Gate XT „Gelain“ vs. r-PLT Gate XT „Pankraz“	%	Ja	< 0.0001
r-PLT Gate XT „Gelain“ vs. r-PLT Gate XT „Oellers“	%	Nein	> 0.9999
r-PLT Gate XT „Gelain“ vs. r-PLT ADVIA	%	Nein	> 0.9999
r-PLT Gate XT „Pankraz“ vs. r-PLT Gate XT „Oellers“	%	Ja	< 0.0001
r-PLT Gate XT „Pankraz“ vs. r-PLT ADVIA	%	Ja	< 0.0001
r-PLT Gate XT „Oellers“ vs. r-PLT ADVIA	%	Nein	> 0.9999

Die r-PLT-Messungen des XT-2000iV mit den Gates nach Oellers et al. und Gelain et al. unterscheiden sich nicht signifikant. Beide Gates zeigen jedoch einen signifikanten Unterschied zu dem Gate nach Pankraz et al. ($p < 0,0001$).

Die r-PLT-Messung mit dem ADVIA 120/2120 zeigt bei p-Werten über 0,9999 keinen signifikanten Unterschied zu den XT-2000iV-Methoden nach Gelain et al. sowie Oellers et al. Lediglich zu der Methode nach Pankraz et al. besteht ein signifikanter Unterschied.

4.2.3 ROC-Kurven

Zur Überprüfung der Trennschärfe der r-PLT-Methode des ADVIA 120/2120 wurden ROC-Kurven angefertigt. Hierbei wird der AUC-Wert angegeben, anhand dessen die Güte der Methode beurteilt werden kann. Außerdem werden die Werte des Standardfehlers, des 95%-Konfidenzintervalls, der z-Statistik und der p-Wert angegeben. Ist der p-Wert $< 0,5$, kann

angenommen werden, dass sich die AUC signifikant von 0,5 unterscheidet und die beurteilte Methode somit Trennschärfe besitzt. Abgebildet ist die ROC-Kurve für die Beurteilung der r-PLT-Messung mit dem ADVIA 120/2120 anhand der Messung mit dem XT-2000iV-Gate nach Oellers et al. Zusätzlich wurde ein Vergleich der verschiedenen ROC-Kurven durchgeführt, die die Messung des ADVIA 120/2120 anhand der verschiedenen XT-2000iV-Messungen bewerten. Es werden die Werte für den Unterschied zwischen den Flächen, Standardfehler, 95%-Konfidenzintervall, z-Wert und Signifikanzlevel tabellarisch dargestellt. Außerdem wird zur Verdeutlichung die vergleichende Darstellung der ROC-Kurven abgebildet.

Tabelle 7; Ergebnisse der ROC-Kurven-Analyse zwischen den r-PLT-XT-2000iV-Gates und dem ADVIA 120/2120-Gate, AUC = Fläche unter der ROC-Kurve (area under the ROC curve), n = 362

verglichene Parameter	AUC	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	z-Wert	Signifikanzlevel p (Fläche = 0,5)
r-PLT XT „Gelain“ vs. r-PLT ADVIA	0,892	0,0222	0,856 bis 0,922	17,700	<0,0001
r-PLT XT „Pankraz“ vs. r-PLT ADVIA	0,903	0,0203	0,868 bis 0,931	19,854	<0,0001
r-PLT XT „Oellers“ vs. r-PLT ADVIA	0,900	0,0212	0,864 bis 0,929	18,855	<0,0001

Abbildung 23; ROC-Kurve zur Cut-Off-Bestimmung der r-PLT Werte von XT-2000iV (Oellers-Gate) und ADVIA 120/2120

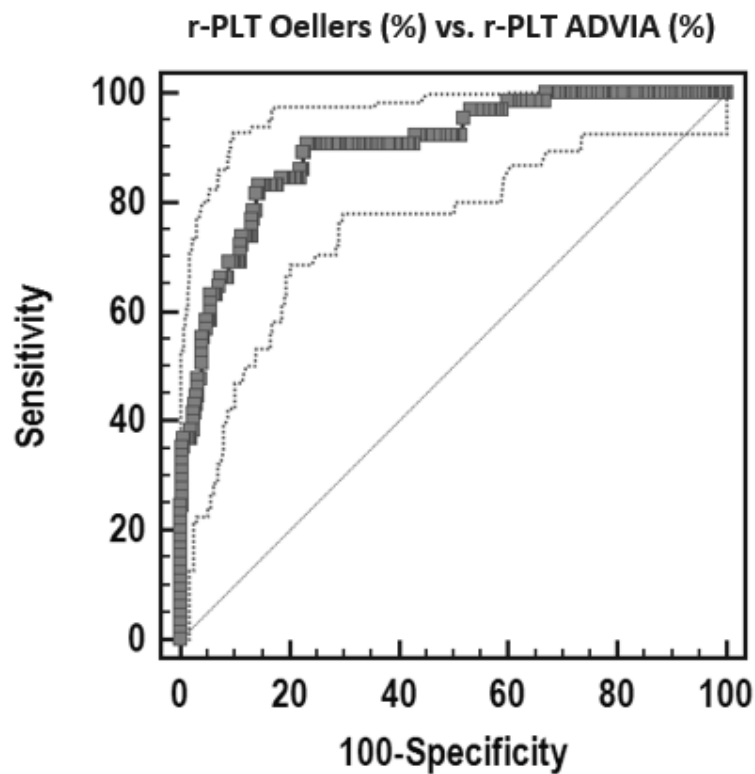
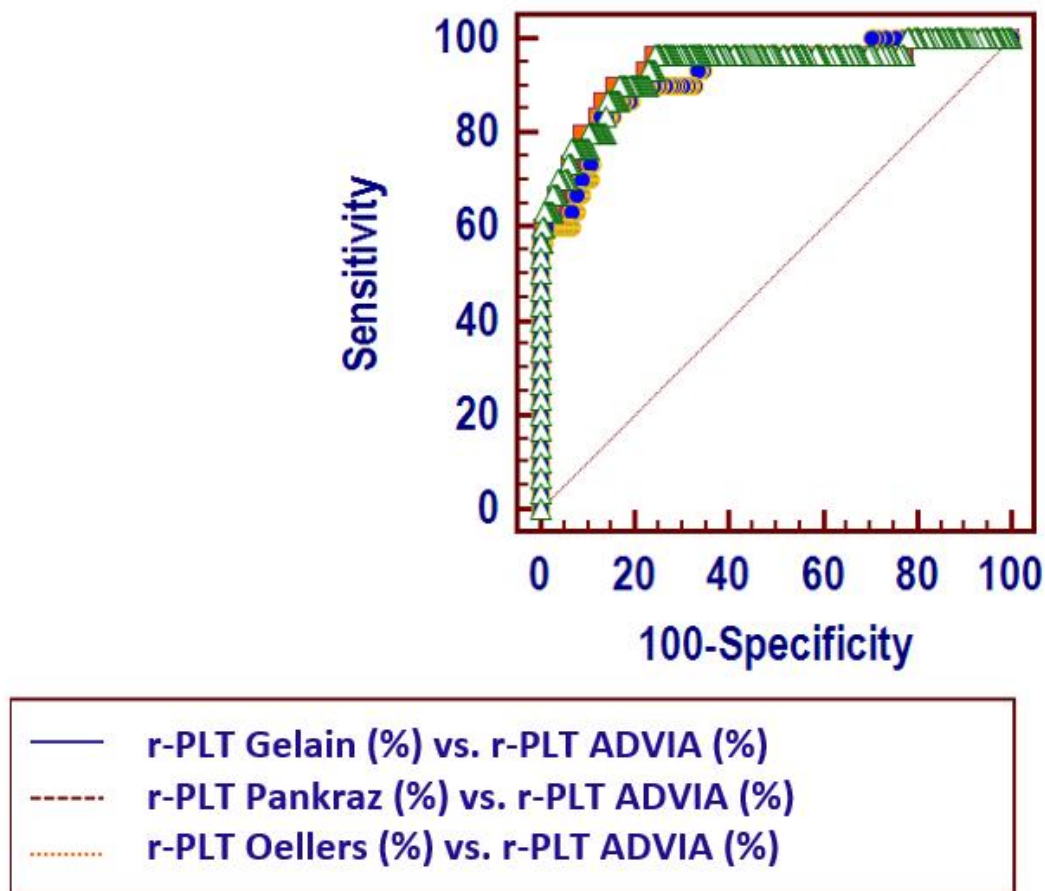


Tabelle 8; paarweiser Vergleich der ROC-Kurven zum Vergleich der r-PLT-Werte von XT-2000iV und ADVIA 120/2120

Kurven	Flächen- unterschied	Standard- fehler	95% Konfidenz- intervall	z-Wert	Signifikanz- level
XT-Gelain/ADVIA vs. XT-Pankraz/ADVIA	0,0141	0,00903	-0,00365 bis 0,0318	1,556	P = 0,1196
XT-Gelain/ADVIA vs. XT-Oellers/ADVIA	0,000552	0,00332	-0,00595 bis 0,00705	0,167	P = 0,8677
XT-Pankraz/ADVIA vs. XT-Oellers/ADVIA	0,0146	0,00952	-0,00406 bis 0,0333	1,534	P = 0,1250

Abbildung 24; Vergleich der ROC-Kurven: die r-PLT-Messung des ADVIA 120/2120 wird gegen die verschiedenen XT-2000iV-Referenzmethoden getestet, n = 362



Die Betrachtung der ROC-Kurven beweist für die r-PLT-Bestimmung des ADVIA 120/2120 mit AUC-Werten zwischen 0,892 und 0,903 eine hohe Trennschärfe. Beim Vergleich der einzelnen ROC-Kurven miteinander unterscheiden sich diese nicht signifikant. Somit hängt die Trennschärfe des ADVIA 120/2120 hierbei nicht von dem als Referenzmethode gewählten XT-2000iV-Gate ab.

4.2.4 Sensitivität und Spezifität

Zur Überprüfung der Cut-Off-Werte wurden Vierfeldertafeln erstellt und Sensitivität und Spezifität angegeben. Die ersten angegebenen Cut-Offs wurden anhand der jeweiligen oberen Referenzwerte und Variationskoeffizienten errechnet (siehe Tabelle 9). Die zweite Tabelle zeigt

die Ergebnisse für Cut-Offs, die anhand der ROC-Kurven ausgewählt wurden (siehe Tabelle 10).

Tabelle 9; Sensitivität und Spezifität für die Cut-Offs r-PLT (XT „Oellers“) $\geq 8,54$ %, r-PLT (ADVIA) $\geq 9,36$ %, n = 362

<i>Anzahl der Hunde:</i>	XT-2000iV positiv	XT-2000iV negativ
<i>ADVIA 120/2120 positiv</i>	15	3
<i>ADVIA 120/2120 negativ</i>	15	329

Sensitivität: 50,00 % Spezifität: 99,10 %
--

Tabelle 10; Sensitivität und Spezifität für die Cut-Offs r-PLT (XT „Oellers“) $\geq 12,80$ %, r-PLT (ADVIA) $\geq 9,36$ %, n = 362

<i>Anzahl der Hunde:</i>	XT-2000iV positiv	XT-2000iV negativ
<i>ADVIA 120/2120 positiv</i>	13	3
<i>ADVIA 120/2120 negativ</i>	4	342

Sensitivität: 76,47 % Spezifität: 99,13 %
--

Die Sensitivität des ADVIA 120/2120 ist stark von dem für den XT-2000iV gewählten Cut-Off abhängig, während die Spezifität mit Werten von 99,13 und 99,10 % in beiden Fällen sehr hoch ist. Für die Cut-Offs r-PLT (XT „Oellers“) $\geq 12,80$ % und r-PLT (ADVIA) $\geq 9,36$ % ergibt sich sowohl eine hohe Sensitivität von 76,47 % als auch eine hohe Spezifität von 99,13 %.

4.2.5 Interferenzen

Bei einigen Proben fielen bei der visuellen Überprüfung der Scattergramme Interferenzen durch kleine Erythrozyten bei den Methoden nach Pankraz et al. und Gelain et al. auf. Diese Erythrozyten befanden sich in dem Gate 4 und wurden so fälschlicherweise als adulte Thrombozyten gezählt.

Die Gefahr einer klinisch bedeutsamen Anzahl von interferierenden kleinen Erythrozyten ergab sich ab einem Anteil von 5% Events in Gate 4, bezogen auf die Gesamtzahl von Events in Gate 1 und 4. Bei 30 von 362 Proben waren über 5 % Events im Gate 4 nachweisbar. Hierbei ergab die visuelle Überprüfung der Scattergramme eine Interferenz von Erythrozyten in allen Fällen.

4.3 Der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern

Um den Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern aufzudecken, wurde die Korrelation zwischen diesen Variablen errechnet und der Spearman-Korrelationskoeffizient angegeben. Für den Sysmex XT-2000iV wurde der Korrelationskoeffizient zwischen den retikulierten Thrombozyten, die anhand der Gates nach Gelain et al., Pankraz et al. und Oellers et al. gemessen wurden, und den Parametern MPV, PCT, P-LCR und PDW bestimmt. Für den ADVIA 120/2120 wurde die Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und den Thrombozytenparametern MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM, PMDW, Large Platelets, RBC Ghosts, RBC Fragments und PLT Clumps ermittelt. Bei der Berechnung wurden die gesamten 362 Tiere einbezogen. Dabei fiel jedoch auf, dass der XT-2000iV bei 42 Blutproben die zu den Thrombozytenparametern gehörenden Werte nicht angegeben hat. Ab einem r-PLT-Wert von 11,61 % (Gelain-Gate) bzw. 11,66 % (Oellers-Gate) gab das Gerät bei keiner Probe die Werte der Thrombozytenparameter an. Daher liegen für die 21 Proben mit den höchsten r-PLT-Werten, die mithilfe des Gates nach Oellers et al. ermittelt wurden, keine Thrombozytenparameter vor. Somit sind die ermittelten Korrelationskoeffizienten nur sehr eingeschränkt aussagekräftig.

Tabelle 11; Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern, Sysmex XT-2000iV, r_s = Spearman Korrelationskoeffizient, n (gesamt) = 362, fehlende Werte = 42, n(ausgewertet) = 320

Parameter und Einheit	r_s
r-PLT „Gelain“ (%) vs. MPV (fl) XT	0,65
r-PLT „Pankraz“ (%) vs. MPV (fl) XT	0,54
r-PLT „Oellers“ (%) vs. MPV (fl) XT	0,65
r-PLT „Gelain“ (%) vs. PCT (%) XT	-0,20
r-PLT „Pankraz“ (%) vs. PCT (%) XT	-0,08
r-PLT „Oellers“ (%) vs. PCT (%) XT	-0,20
r-PLT „Gelain“ (%) vs. P-LCR (%) XT	0,63
r-PLT „Pankraz“ (%) vs. P-LCR (%) XT	0,52
r-PLT „Oellers“ (%) vs. P-LCR (%) XT	0,63
r-PLT „Gelain“ (%) vs. PDW (fl) XT	0,65
r-PLT „Pankraz“ (%) vs. PDW (fl) XT	0,56
r-PLT „Oellers“ (%) vs. PDW (fl) XT	0,65

Für die Korrelation zwischen dem r-PLT-Anteil und den Thrombozytenparametern des XT-2000iV ergeben sich teilweise höhere Korrelationskoeffizienten bis zu 0,65. Diese sind jedoch aufgrund der 42 fehlenden Werte nur bedingt aussagekräftig.

Tabelle 12; Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern, ADVIA 120/2120, r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient, n = 362

Parameter und Einheit	r_s
r- PLT ADVIA (%) vs. MPV (fl) ADVIA	0,25
r- PLT ADVIA (%) vs. PDW (%) ADVIA	0,14
r- PLT ADVIA (%) vs. PCT (%) ADVIA	-0,42
r- PLT ADVIA (%) vs. MPC (g/dl) ADVIA	0,24
r- PLT ADVIA (%) vs. PCDW (g/dl) ADVIA	-0,10
r- PLT ADVIA (%) vs. MPM (pg) ADVIA	0,48
r- PLT ADVIA (%) vs. PMDW(pg) ADVIA	0,71
r- PLT ADVIA (%) vs. Large PLTs ($10^9/l$) ADVIA	-0,13
r- PLT ADVIA (%) vs. RBC Ghosts ($10^{12}/l$) ADVIA	-0,22
r- PLT ADVIA (%) vs. RBC Fragments ($10^{12}/l$) ADVIA	-0,35
r- PLT ADVIA (%) vs. % PLT Clumps (%) ADVIA	-0,03
r- PLT ADVIA (%) vs. # PLT Clumps ADVIA	0,11

Für die Korrelation zwischen dem r-PLT-Anteil und den Thrombozytenindizes des ADVIA 120/2120 ergeben sich größtenteils niedrige Koeffizienten zwischen -0,03 und 0,48. Eine Ausnahme stellt lediglich die Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse (PMDW) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,71 dar. Der y-Achsenabschnitt („intercept“) liegt hier bei 0,71 (95 % CI: 0,70 bis 0,73), während die Steigung („slope“) einen Wert von 0,06 (95 % CI: 0,05 bis 0,07) aufweist.

4.4 Referenzintervalle

Die Referenzwerte werden tabellarisch dargestellt und für die verschiedenen untersuchten Populationen separat aufgeführt. Als Erstes werden die Referenzintervalle angegeben, die an der Gesamtheit der untersuchten gesunden Hunde erstellt wurden. Diese Gruppe umfasst 153 unter definierten Bedingungen gehaltene Beagle und 40 als Haustiere gehaltene Hunde anderer Rassen. Danach werden die Referenzwerte der Beagle-Gruppe und anschließend die der Hunde anderer Rassen aufgezeigt. Innerhalb dieser Einteilung sind zunächst die Werte der retikulierten Thrombozyten beider Geräte aufgeführt, bevor die Thrombozytenparameter nach Geräten geordnet folgen. Zu jedem Parameter wird das obere 97,5%- und untere 2,5%-Referenzlimit sowie das obere und untere 90%-Konfidenzintervall (CI) gezeigt.

Die dazugehörigen Graphen sind auf der beiliegenden CD zu finden.

4.4.1 Alle Hunde

Tabelle 13; alle gesunden Hunde, r-PLT, n=193, Methode: Nichtparametrisch

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
r-PLT ADVIA	%	0,5	6,1	0,4 – 0,6	3,9 – 6,9
r-PLT XT „Gelain“	%	0,2	3,7	0,1 – 0,3	2,7 – 6,9
r-PLT XT „Pankraz“	%	0,0	1,2	0,0 – 0,0	1,0 – 2,2
r-PLT XT „Oellers“	%	0,2	3,9	0,1 – 0,3	2,8 – 7,0
r-PLT ADVIA	10 ⁹ /l	1,3	10,9	0,9 – 1,4	7,9 – 13,2
r-PLT XT „Gelain“	10 ⁹ /l	0,4	5,7	0,3 – 0,6	4,9 – 8,7
r-PLT XT „Pankraz“	10 ⁹ /l	0,1	2,1	0,0 – 0,1	1,8 – 2,9
r-PLT XT „Oellers“	10 ⁹ /l	0,4	5,6	0,3 – 0,6	4,9 – 8,7

Tabelle 14; alle gesunden Hunde, ADVIA 120/2120 Thrombozytenparameter, n=193, Methode: Nichtparametrisch

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
PLT	10 ⁹ /l	182,7	448,1	174,0 – 197,0	412,0 – 502,0
MPV	fl	8,9	18,4	7,5 – 10,2	17,3 – 18,9
PDW	%	53,0	73,0	44,8 – 56,3	71,1 – 75,4
PCT	%	0,2	0,6	0,2 – 0,3	0,6 – 0,7
MPC	g/dl	16,8	23,5	15,8 – 17,3	22,5 – 25,4
PCDW	g/dl	4,4	8,7	4,0 – 5,4	8,7 – 9,0
MPM	pg	1,7	2,7	1,6 – 1,8	2,6 – 2,9
PMDW	pg	0,6	1,0	0,6 – 0,7	1,0 – 1,0
Large PLTs	10 ⁹ /l	9,7	97,8	6,0 – 16,0	89,0 – 112,0
RBC Ghosts	10 ¹² /l	0,0	0,0	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0
RBC Fragments	10 ¹² /l	0,0	0,0	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0
% PLT Clumps	%	0,4	5,2	0,3 – 0,5	2,9 – 10,4
# PLT Clumps	Number (events)	33,9	460,7	23,0 – 38,0	187,0 – 973,0

Tabelle 15; alle gesunden Hunde, Sysmex XT-2000iV Thrombozytenparameter, PLT-I u. PLT-O: n=193 bzw. PCT, P-LCR, MPV u. PDW: n=190, Methode: Nichtparametrisch

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
MPV	fl	8,6	12,5	8,3 – 8,9	12,1 – 12,8
PCT	%	0,2	0,4	0,2 – 0,2	0,4 – 0,4
P-LCR	%	14,1	43,0	12,1 – 15,9	41,3 – 44,7
PDW	fl	8,8	16,6	8,4 – 9,2	14,7 – 18,0
PLT-I	10 ⁹ /l	161,8	425,0	149,0 – 175,0	381,0 – 438,0
PLT-O	10 ⁹ /l	150,9	397,5	141,0 – 169,0	355,0 – 416,0

4.4.2 Beagle

Tabelle 16; Beagle, r-PLT, n=153, Methode: Nichtparametrisch

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
r-PLT ADVIA	%	0,5	3,5	0,5 – 0,6	2,8 – 8,2
r-PLT XT „Gelain“	%	0,2	2,4	0,1 – 0,3	2,1 – 4,5
r-PLT XT „Pankraz“	%	0,0	1,0	0,0 – 0,0	0,7 – 1,3
r-PLT XT „Oellers“	%	0,2	2,4	0,1 – 0,3	2,1 – 4,5
r-PLT ADVIA	10 ⁹ /l	1,3	7,4	1,2 – 1,5	5,4 – 13,2
r-PLT XT „Gelain“	10 ⁹ /l	0,4	4,2	0,3 – 0,5	3,7 – 6,5
r-PLT XT „Pankraz“	10 ⁹ /l	0,1	1,7	0,0 – 0,1	1,4 – 2,2
r-PLT XT „Oellers“	10 ⁹ /l	0,4	4,2	0,3 – 0,5	3,6 – 6,4

Tabelle 17; Beagle, ADVIA 120/2120 Thrombozytenparameter, n=153, Methode: Nichtparametrisch

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
PLT	10 ⁹ /l	184,7	419,4	129,0 – 209,0	406,0 – 502,0
MPV	fl	11,2	18,5	10,4 – 11,7	17,7 – 20,0
PDW	%	60,7	74,6	57,7 – 62,2	71,4 – 76,3
PCT	%	0,3	0,6	0,2 – 0,3	0,6 – 0,7
MPC	g/dl	17,4	22,5	16,5 – 17,8	22,1 – 23,2
PCDW	g/dl	6,2	8,8	5,4 – 6,6	8,7 – 9,0
MPM	pg	2,0	2,7	1,9 – 2,0	2,6 – 3,0
PMDW	pg	0,7	1,0	0,7 – 0,7	1,0 – 1,1
Large PLTs	10 ⁹ /l	24,9	102,3	14,0 – 26,0	90,0 – 114,0
RBC Ghosts	10 ¹² /l	0,0	0,0	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0
RBC Fragments	10 ¹² /l	0,0	0,0	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0
% PLT Clumps	%	0,4	3,1	0,4 – 0,5	2,4 – 10,4
# PLT Clumps	Number (events)	37,0	205,5	34,0 – 39,0	152,0 – 765,0

Tabelle 18; Beagle, Sysmex XT-2000iV Thrombozytenparameter, PLT-I u. PLT-O: n=153 bzw. MPV, PCT P-LCR u. PDW: n=152, Methode: Nichtparametrisch

Parameter	Einheit	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
MPV	fl	8,8	12,3	8,6 – 8,9	12,1 – 13,4
PCT	%	0,2	0,4	0,2 – 0,2	0,4 – 0,5
P-LCR	%	15,5	43,1	14,1 – 16,8	41,3 – 48,2
PDW	fl	9,0	15,4	8,7 – 9,3	14,5 – 18,0
PLT-I	10 ⁹ /l	176,7	406,9	155,0 – 194,0	377,0 – 452,0
PLT-O	10 ⁹ /l	172,8	377,1	161,0 – 184,0	351,0 – 416,0

4.4.3 Hunde verschiedener Rassen

Tabelle 19; Hunde verschiedener Rassen, gesund, r-PLT, n=40

Parameter	Einheit	Methode	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
r-PLT ADVIA	%	Nichtparametrisch	0,3	6,9	0,3 – 0,5	6,1 – 6,9
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,3	9,3	0,2 – 0,4	6,1 – 13,6
r-PLT XT „Gelain“	%	Nichtparametrisch	0,2	7,4	0,2 – 0,3	3,7 – 7,5
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,2	6,8	0,1 – 0,3	4,8 – 9,3
r-PLT XT „Pankraz“	%	Nichtparametrisch	0,0	2,3	0,0 – 0,0	1,2 – 2,3
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,0	2,2	0,0 – 0,0	1,6 – 2,8
r-PLT XT „Oellers“	%	Nichtparametrisch	0,2	7,5	0,2 – 0,3	4,6 – 7,5
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,2	7,1	0,1 – 0,3	5,0 – 9,7
r-PLT ADVIA	10 ⁹ /l	Nichtparametrisch	0,8	15,4	0,8 – 1,2	12,2 – 15,5
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,8	16,9	0,7 – 1,1	11,2 – 23,4

Tabelle 19; Fortsetzung

r-PLT XT „Gelain“	10 ⁹ /l	Nichtparametrisch	0,4	9,5	0,4 – 1,0	5,6 – 9,5
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,3	6,4	0,1 – 0,4	5,0 – 8,0
r-PLT XT „Pankraz“	10 ⁹ /l	Nichtparametrisch	0,0	3,2	0,0 – 0,1	2,7 – 3,2
		Nicht symmetrisch oder normalverteilt				
r-PLT XT „Oellers“	10 ⁹ /l	Nichtparametrisch	0,4	9,5	0,4 – 1,0	8,0 – 9,5
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,5	10,0	0,3 – 0,7	7,5 – 12,6

Tabelle 20; Hunde verschiedener Rassen, gesund, ADVIA 120/2120 Thrombozytenparameter, n=40

Parameter	Einheit	Methode	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
PLT	10 ⁹ /l	Nichtparametrisch	177,1	601,0	177,0 – 183,3	428,5 – 604,0
		Robust	101,2	496,1	45,6 – 147,0	445,5 – 551,1
MPV	fl	Nichtparametrisch	7,3	15,5	7,3 – 8,4	14,9 – 15,5
		Robust	7,7	16,4	6,5 – 8,7	15,5 – 17,3
PDW	%	Nichtparametrisch	39,1	71,1	39,0 – 51,0	68,4 – 71,1
		Robust	47,2	74,9	43,5 – 51,1	70,7 – 78,1

Tabelle 20; Fortsetzung

PCT	%	Nichtparametrisch	0,2	0,7	0,2 – 0,2	0,6 – 0,7
		Parametrisch, Box-Cox-Transformation	0,2	0,7	0,2 – 0,2	0,6 – 0,8
MPC	g/dl	Nichtparametrisch	15,7	25,5	15,7 – 16,3	23,8 – 25,5
		Robust	13,7	24,5	12,4 – 14,8	23,1 – 26,0
PCDW	g/dl	Nichtparametrisch	3,8	8,4	3,8 – 4,1	7,6 – 8,4
		Robust	4,0	9,2	3,3 – 4,8	8,6 – 9,7
MPM	pg	Nichtparametrisch	1,5	2,4	1,5 – 1,7	2,2 – 2,4
		Robust	1,5	2,4	1,4 – 1,6	2,3 – 2,5
PMDW	pg	Nichtparametrisch	0,6	1,0	0,6 – 0,6	0,9 – 1,0
		Robust	0,5	1,0	0,5 – 0,6	0,9 – 1,0
Large PLTs	10 ⁹ /l	Nichtparametrisch	4,1	81,9	4,0 – 8,0	71,0 – 82,0
		Robust, Box-Cox-Transformation	3,9	95,8	2,3 – 6,7	76,6 – 114,3
RBC Ghosts	10 ¹² /l	Nichtparametrisch	0,0	0,0	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0
RBC Fragments	10 ¹² /l	Nichtparametrisch	0,0	0,0	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0
% PLT Clumps	%	Nichtparametrisch	0,3	14,4	0,3 – 0,4	4,3 – 14,5
		Robust, Box-Cox-Transformation	0,3	8,0	0,3 – 0,3	4,2 – 13,5
# PLT Clumps	Number (Events)	Nichtparametrisch	22,0	1125,1	22,0 – 33,0	247,0 – 1129,0

**Tabelle 21; Hunde verschiedener Rassen, gesund, Sysmex XT-2000iV Thrombozytenparameter, PLT-I u. PLT-O:
n=40 bzw. MPV, PCT, PDW, P-LCR: n =38**

Parameter	Einheit	Methode	Unteres Referenzlimit	Oberes Referenzlimit	Unteres CI (90 %)	Oberes CI (90 %)
MPV	fl	Robust	7,9	12,8	7,4 – 8,4	12,3 – 13,4
PCT	%	Robust, Box-Cox- Transformation	0,2	0,4	0,1 – 0,2	0,4 – 0,5
P-LCR	%	Parametrisch	9,1	45,8	5,3 – 13,1	41,5 – 49,8
PDW	fl	Robust, Box-Cox- Transformation	7,9	18,3	7,5 – 8,6	16,4 – 20,5
PLT-I	10 ⁹ /l	Nichtparame- trisch	140,2	438,0	140,0 – 163,0	394,9 – 438,0
		Robust, Box-Cox- Transformation	125,6	452,0	115,5 – 143,7	405,3 – 501,8
PLT-O	10 ⁹ /l	Nichtparame- trisch	138,1	415,5	138,0 – 150,0	355,0 – 416,0
		Robust, Box-Cox- Transformation	121,6	418,9	110,6 – 137,1	375,2 – 467,7

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit soll die Messung retikulierter Thrombozyten mit zwei verschiedenen automatischen Hämatologiegeräten an einer großen Anzahl Hunde-Vollblut-Proben ($n = 362$) geprüft werden. Hierbei werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs, Cut-Off-Werte sowie Referenzwerte angegeben. Des Weiteren wird der Zusammenhang zwischen dem Anteil retikulierter Thrombozyten und der Thrombozytengröße untersucht.

Die Messung retikulierter Thrombozyten des Hundes mit dem Sysmex XT-2000iV wurde bisher nur von Pankraz et al. und Gelain et al. beschrieben (Pankraz et al., 2009; Gelain et al., 2010a). In der vorliegenden Arbeit wird diese Methode nun erstmals an einer großen Probenzahl geprüft. Die Messung retikulierter Thrombozyten mithilfe des ADVIA 120/2120 wurde bisher weder für Mensch noch Tier beschrieben und ist somit vollkommen neu.

5.1 Präzision

Die Berechnung der Präzision dient dazu, die Reproduzierbarkeit des gemessenen Parameters zu ermitteln. Sie ist ein Maß für die Messgenauigkeit eines Parameters bezogen auf das verwendete Gerät. Hier wurde die Präzision innerhalb der Serie geprüft.

Der Variationskoeffizient (CV) der r-PLT-Messung nimmt sowohl bei dem Sysmex XT-2000iV als auch bei dem ADVIA 120/2120 Werte über 20 % an und ist somit im Vergleich zu den in der Hämatologie geforderten Höchstwerten als hoch zu bezeichnen. Bei der Messung mit dem ADVIA 120/2120 beträgt der CV für den relativen und absoluten r-PLT-Wert 35,64 bzw. 36,97 %. Die Messung mithilfe des Sysmex XT-2000iV und den Gates nach Gelain et al. und Oellers et al. liefert niedrigere CV-Werte. Für den prozentualen und absoluten r-PLT-Wert ergeben sich hier Variationskoeffizienten zwischen 22,02 und 22,04 % bzw. 21,36 und 21,38 %. Das Gate nach Pankraz et al. zeigt mit 41,14 bzw. 40,10 % eine deutlich höhere Schwankung. Ein Grund hierfür dürfte die geringere Größe des Gates nach Pankraz et al. sein. Das Gate befindet sich im Scattergramm deutlich weiter rechts und erfasst somit nur Zellen einer höheren Fluoreszenz. Dadurch werden im Vergleich zu den anderen Gates stets weniger retikulierte Thrombozyten gemessen, was sich auch an den im Vergleich niedriger ausfallenden Referenzwerten zeigt. So haben schon geringe Schwankungen der absoluten r-PLT-Zahl prozentual eine deutliche

Auswirkung und führen dadurch zu einem höheren CV. Ein Vorteil des Oellers-Gate im Vergleich zum Pankraz-Gate ist hier also ganz klar in der geringeren Varianz zu sehen.

Ein anderer zu berücksichtigender Aspekt ist die zur Überprüfung der Varianz getroffene Patientenwahl. Die mit dem ADVIA 120/2120 gemessene Probe weist mit Werten von $318,45 \pm 21,97 \cdot 10^9/l$ eine eher höhere Thrombozytenzahl auf und der r-PLT-Wert liegt hier mit $0,73 \pm 0,26 \%$ im unteren Referenzbereich. Auch hierdurch schlagen sich geringere absolute Abweichungen schnell in einem hohen CV nieder. Die zwecks Varianzprüfung mit dem XT-2000iV gemessenen r-PLT-Werte überschreiten den oberen Referenzbereich, sind aber auch nicht stark erhöht. Insgesamt sprechen solch hohe Variationskoeffizienten für eine schlechte Messgenauigkeit und sollten bei der Interpretation der Messergebnisse berücksichtigt werden. Pankraz et al. beschrieben ebenfalls einen hohen Variationskoeffizienten bei der r-PLT-Messung mit dem Sysmex XT-2000iV. Bei gesunden Hunden befand er sich zwischen 26,55 und 66,85 %. Bei Patienten mit gesteigerter Thrombopoese ließ sich ein besserer CV mit Werten zwischen 8,75 und 11,83 % feststellen (Pankraz et al., 2009). Briggs et al. beschrieben für die Messung beim Menschen mit einem vergleichbaren Sysmex-Gerät einen CV zwischen 2,04 und 14,27 %, je nach Probe (Briggs et al., 2004). Für die Messung retikulierter Thrombozyten des Hundes mithilfe des Durchflusszytometers sind Variationskoeffizienten zwischen 5 und 15,6 % beschrieben (Smith und Thomas, 2002; Wilkerson et al., 2001). Somit zeigt sich insgesamt eine große Varianz bei der Messung retikulierter Thrombozyten.

Die Varianz der Thrombozytenzählung des ADVIA 120/2120 ist mit einem Variationskoeffizienten von 6,90 % als gering und damit als gut zu bezeichnen. Die Präzision der Parameter MPV (CV = 5,49 %), PDW (CV = 4,14 %), MPC (CV = 3,77 %), PCDW (CV = 5,79 %), MPM (CV = 1,03 %), PMDW (CV = 2,85 %) ist mit Variationskoeffizienten zwischen 1,03 und 5,79 % sogar noch besser. Etwas höher fällt mit 7,32 % der Variationskoeffizient für den Parameter PCT aus. Die Variationskoeffizienten bei der Messung der Large PLTs, RBC Ghosts, RBC Fragments und PLT Clumps sind mit Werten zwischen 17,78 % (RBC Fragments) und 458,42 % (# PLT Clumps) hoch. Moritz kam bei der Beurteilung der Thrombozytenmessung des ADVIA 120 beim Hund zu insgesamt besseren Werten der Präzision. Die Variationskoeffizienten zur Beurteilung der Präzision innerhalb der Serie fielen hier für die Parameter PLT (CV = 2,9 %), MPV (CV = 3,0 %) und PDW (CV = 3,6 %) allesamt kleiner und dadurch die Präzision besser aus (Moritz, 2000). Bezüglich der anderen in der vorliegenden Arbeit ermittelten Parameter lassen sich in der Literatur keine Angaben zu der Präzision innerhalb der Serie beim ADVIA 120/2120 finden.

Die Präzisionsbestimmung der Thrombozytenzählung des Sysmex XT-2000iV ergibt für die Impedanz- und die optische Messung niedrige Variationskoeffizienten von 2,98 % und 5,56 %. Auch die Präzision der übrigen Thrombozytenparameter MPV (CV = 1,86 %), PCT (CV = 4,52 %), P-LCR (CV = 2,72 %) und PDW (CV = 6,75 %) befindet sich in diesem Bereich.

Die hier für die Thrombozytenzahl ermittelten Variationskoeffizienten passen zu Angaben aus der Literatur. So geben Serra et al. für die optische Thrombozyten-Messung mit dem Sysmex XT-2000iV beim Hund Variationskoeffizienten zwischen 3,04 und 3,71 % an, die somit, verglichen mit der hier ermittelten, eine etwas bessere Präzision zeigen, sich aber in einem ähnlichen Bereich befinden (Serra et al., 2012). Auch Lilliehöök et al. geben für die optische Thrombozytenmessung einen CV zwischen 2 und 4 % für Proben mit normaler Thrombozytenzahl an. Der angegebene Variationskoeffizient der Impedanzmessung befindet sich in einem Bereich zwischen 2 und 5 %, in dem auch der in dieser Arbeit ermittelte CV liegt. Bei Proben thrombozytopenischer Hunde (55 bzw. 46 x 10⁹/l) ermittelten sie jedoch einen CV von 7 % für die optische Messung und einen CV von 19 % für die Impedanzmessung (Lilliehöök und Tvedten, 2009).

Angaben zu den Variationskoeffizienten der anderen Thrombozytenparameter für die Präzision des XT-2000iV innerhalb der Serie beim Hund wurden in der Literatur nicht gefunden. Jedoch existiert auch hier grundsätzlich das Phänomen eines höheren Variationskoeffizienten bei niedriger Thrombozytenzahl. Ogura et al. berichten ebenfalls bei der Impedanzmessung von einem hohen Variationskoeffizienten der Thrombozytenindizes MPV, PDW und P-LCR bei niedrigen Thrombozytenzahlen. Verglichen mit Proben, die Thrombozytenzahlen über 100 x 10⁹/l aufweisen, ist der CV mindestens dreifach erhöht, wenn die Thrombozytenzahlen unter 50 x 10⁹/l liegen (Ogura et al., 1995). Daher muss bedacht werden, dass der CV der Thrombozytenindizes bei Proben mit geringerer Thrombozytenzahl höher ausfallen kann als bei den hier untersuchten Messungen.

5.2 Methodenvergleich

5.2.1 Die Messung retikulierter Thrombozyten mit verschiedenen Gates beim Sysmex XT-2000iV

Bei dem Vergleich der verschiedenen Gates des Sysmex XT-2000iV untereinander fällt durchweg eine sehr gute Korrelation auf. Für die Korrelation der Gates „A“, „Gelain“ und „Oellers“ miteinander ergeben sich hohe Spearman-Korrelationskoeffizienten von 0,99 bis 1,00 und eine sehr niedrige mittlere Abweichung („bias“) von -0,1 und 0,1. Die Korrelation des Gates nach Pankraz et al. zu den anderen Gates ist mit Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen 0,86 und 0,89 etwas geringer. Die mittlere Abweichung zeigt hier mit Werten zwischen 1,9 und 2,1 einen Methodenunterschied. Auch waren die Referenzwerte für die r-PLT-Messung nach Pankraz et al. niedriger im Vergleich zu der Messung nach Gelain et al. oder Oellers et al. So zeichnet sich in beiden Fällen die andere Gate-Setzung deutlich ab. Durch das Gate nach Pankraz et al. werden lediglich hochfluoreszierende Thrombozyten gemessen, während die Gates nach Gelain et al. und Oellers et al. zusätzlich mittelgradig fluoreszierende Thrombozyten einbeziehen und dadurch höhere r-PLT-Werte detektieren. Auch der Medianwert der Messung nach Pankraz et al. liegt mit 0,40 % deutlich unter den Werten von 1,33 % der anderen Gates. Das gemessene Maximum lag bei der Messung nach Pankraz et al. bei 35,02 %, während sich mit den Gates nach Gelain et al. und Oellers et al. relative r-PLT-Zahlen von 54,89 bzw. 57,34 % feststellen ließen. Zu diesen Beobachtungen passt ebenfalls das Ergebnis der Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Methoden. Der angepasste p-Wert ist bei dem Vergleich der Methode nach Pankraz et al. mit den beiden anderen Methoden des XT-2000iV kleiner als 0,0001. Daher ist davon auszugehen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Methoden besteht, was somit zu den oben aufgeführten Feststellungen passt. Die Methoden nach Gelain et al. und Oellers et al. zeigen beim Vergleich miteinander keinen signifikanten Unterschied.

Gelain et al. erstellten ihr Gate anhand der morphologischen Überprüfung von Scattergrammen gesunder Hunde. Sie nutzten dieses Gate anschließend, um die Scattergramme von Norfolk Terriern zu beurteilen, bei denen eine Makrothrombozytopenie auffiel. Dazu wurden diese mit Scattergrammen gesunder Hunde sowie kranker Hunde mit gesteigerter und reduzierter Thrombopoese verglichen. Bei der Gate-Setzung im Verlauf der vorliegenden Arbeit dienten die von Gelain et al. und Pankraz et al. publizierten Gates als Orientierung. Wir richteten uns hier nach der Position der Gates im Scattergramm und prüften die Gate-Setzung an zahlreichen

eigenen Messungen. Es ist jedoch zu sagen, dass abhängig von gerätespezifischen Einstellungen die Position der Thrombozytenpopulation und damit auch der gesetzten Gates im Scattergramm anders dargestellt sein kann. Daher kann nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden, dass die von uns generierten Gates nach Pankraz et al. und Gelain et al. mit den publizierten Gates vollständig übereinstimmen. Bei den in dieser Arbeit analysierten Gates handelt es sich um fixe Gates. Im Gegensatz zu Gates, die mittels einer Algorithmus-Funktion an der jeweiligen Thrombozytenpopulation ausgerichtet werden, kann es bei fixen Gates zu Schwierigkeiten bei der Trennung der Zellpopulationen und damit zu Interferenzen kommen. Bei der Betrachtung der Scattergramme aller im Laufe dieser Arbeit untersuchten Proben fiel auf, dass für den überwiegenden Teil der Proben die Position der untersuchten Gates zwischen retikulierten Thrombozyten und Retikulozyten richtig gewählt ist und nicht verändert werden sollte. Bei einigen Proben wird die daraus entstandene mäßige Trennung der Populationen daher in Kauf genommen. Beispielsweise werden hier teilweise Retikulozyten als retikulierte Thrombozyten erfasst oder einige retikulierte Thrombozyten entgehen der Zählung, da sie sich im Bereich der Retikulozyten und somit außerhalb des Gates befinden. Dies verdeutlicht die unten stehende Abbildung. Bei diesen beiden Proben ist die Position des fixen Gates nicht optimal gewählt, was durch die eingezeichnete optimale Lage des Gates verdeutlicht wird (siehe Abbildung 25).

Das eigene Gate „Oellers“ wurde bei der Reanalyse der XT-2000iV-Messungen erstellt, da bei mehreren Messungen Schwierigkeiten in der Trennung der Populationen auffielen. Vor allem bei den in dieser Klinik untersuchten kranken Hunden fiel teilweise ein Problem in der Trennung der älteren Erythrozyten und Thrombozyten bei den Gates nach Pankraz et al. und Gelain et al. auf. Hierbei fielen Anteile der Erythrozytenpopulation in den Zählbereich der Thrombozyten. Bei 30 der 362 untersuchten Proben fiel eine klinisch bedeutsame Interferenz durch kleine Erythrozyten auf. Da durch diese Interferenzen der Wert der Thrombozytengesamtzahl verändert wird und dies einen Einfluss auf die prozentuale Zahl der retikulierten Thrombozyten haben kann, wurde das Gate „Oellers“ erstellt. Dieses Gate stellt ein optimiertes „Gelain“-Gate dar. Es basiert auf demselben Prinzip bezüglich der Trennung retikulierter Thrombozyten von adulten Thrombozyten. Bei der Erstellung des „Oellers“-Gate wurde jedoch die Abgrenzung von „reifen“ Erythrozyten und schwach fluoreszierenden Retikulozyten (LFR) zu Thrombozyten und retikulierten Thrombozyten verbessert, da die betreffende Grenzlinie nach unten verschoben wurde. Der hauptsächliche Vorteil des „Oellers“-Gate ist, dass nur noch Zellen einer geringeren Größe als reife Thrombozyten erfasst werden. Bei der statistischen Berechnung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Gate

nach Oellers et al. und dem ähnlichen Gate nach Gelain et al. Bei einzelnen Proben führt es jedoch zu abweichenden prozentualen r-PLT-Werten (siehe Abbildung 26). Hier zeigt sich, dass bei dem „Oellers“-Gate die Abtrennung der Thrombozyten im Vergleich zu den Gates nach Pankraz et al. und Gelain et al. optimiert ist und Interferenzen minimiert sind.

Bei sechs der 362 analysierten Proben fielen zusätzlich Events auf, die sich ebenfalls im r-PLT-Gate befanden, aber unterhalb der Population der retikulierten Thrombozyten zu sehen waren (siehe Abbildung 27). In diesem Bereich vorkommende Events sind für den Menschen als Fragmente der weißen Blutzellen (WBC-fragments) beschrieben und kommen bei Patienten unter Chemotherapie vor (Rowan und Linssen, 2005). Für den Hund wurde dies noch nicht beschrieben. Da sich diese Events innerhalb des r-PLT-Gates befinden, könnten sie prinzipiell zu Fehlmessungen führen. Bei den untersuchten Messungen war jedoch lediglich eine zu vernachlässigende Anzahl an „WBC-fragments“ zu sehen, die zu keiner relevanten Änderung des r-PLT-Werts führte.

Abbildung 25; Problem der fixen Gates beim Sysmex XT-2000iV: Die optimalen Gates sind schematisch dargestellt (weiß). Oben im Bild ist das Scattergramm einer Probe zu sehen, bei der das fixe Gate zu klein ist, sodass einige retikulierte Thrombozyten der Zählung entgehen. Das optimale Gate (weiß) muss bei dieser Probe größer sein. Unten im Bild ist das Scattergramm einer Probe, bei der das fixe Gate zu groß ist. Es werden fälschlicherweise Retikulozyten als retikulierte Thrombozyten gezählt. Das ideale Gate (weiß) schließt diese aus. Bei den meisten im Laufe dieser Arbeit untersuchten Proben war die Position des fixen Gates jedoch passend.

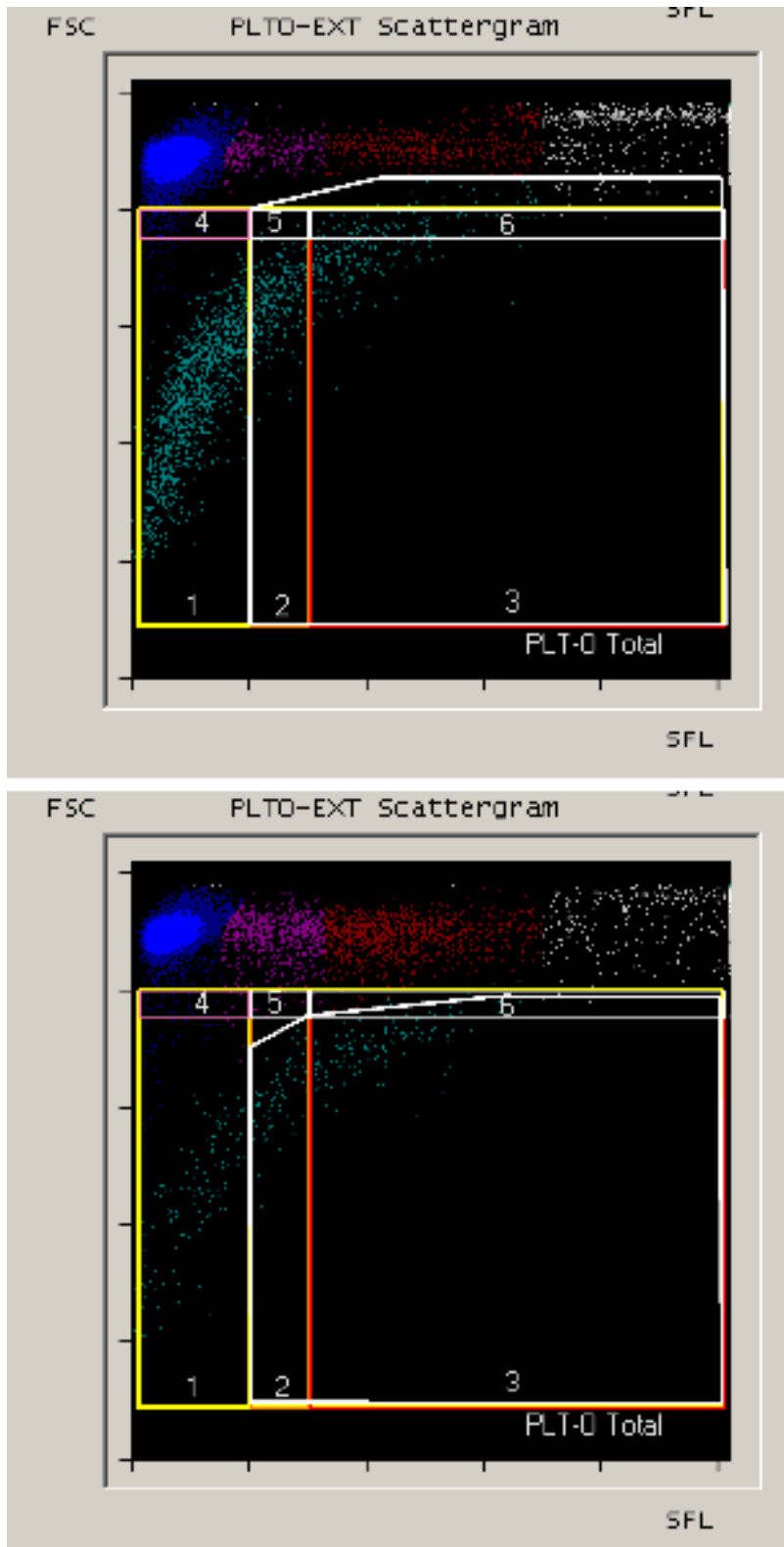


Abbildung 26; die Gates nach Gelain et al. und Oellers et al. bei kritischen Proben: Bei dem Scattergramm dieser Probe zeigt sich das Problem der Gates nach Pankraz et al. und Gelain et al. Bei beiden Gates werden kleine Erythrozyten als Thrombozyten gezählt, sodass es zu erheblichen Interferenzen und einem fehlerhaften prozentualen r-PLT-Wert kommt. Durch das optimierte „Gelain“-Gate, das „Oellers“-Gate, werden erheblich weniger Erythrozyten als Thrombozyten gezählt und folglich die Gefahr von Interferenzen minimiert.

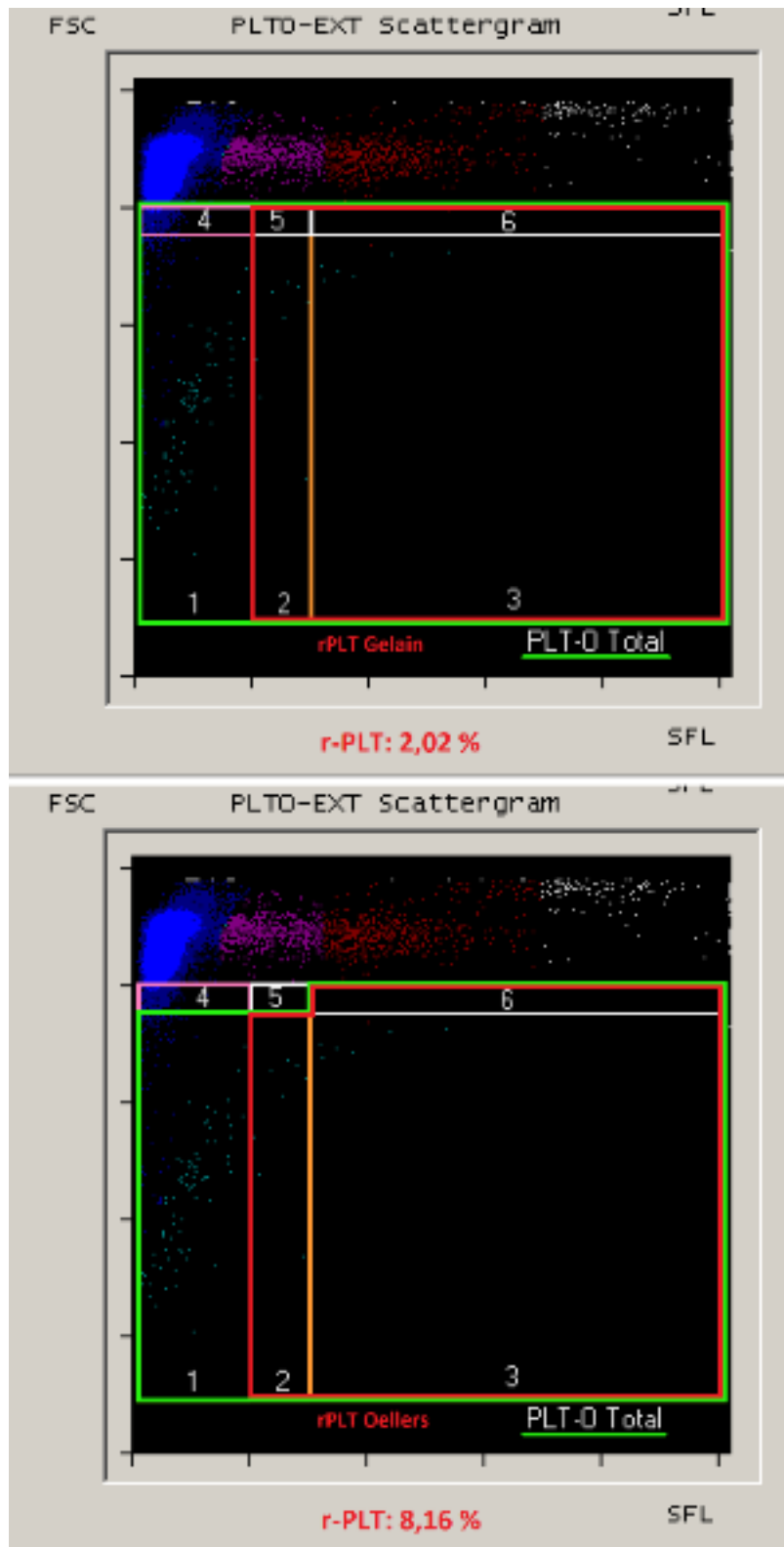
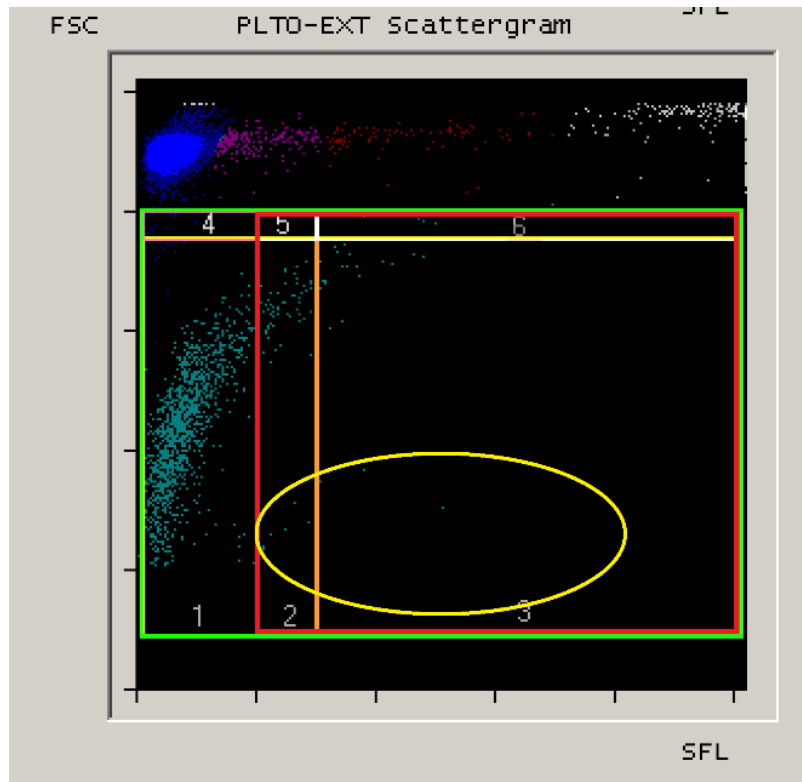


Abbildung 27; eine Probe mit „WBC-fragments“ (gelb umrandet) im r-PLT-Gate: Bei dem Scattergramm dieser Probe ist im Gate der r-PLT eine weitere Population von Events zu sehen. Aus der Humanmedizin sind diese Events als WBC-fragments bekannt, wurden aber bisher noch nicht in der Veterinärmedizin beschrieben. Bei der vorliegenden Arbeit traten diese Events lediglich bei sechs der 362 untersuchten Proben auf und machten stets eine zu vernachlässigende Anzahl aus.



5.2.2 Die Messung retikulierter Thrombozyten mit dem ADVIA 120/2120

Zur Messung retikulierter Thrombozyten mit dem ADVIA 120/2120 wurde, wie schon beschrieben, ein Playback der bei den ursprünglichen Messungen erstellten Dateien durchgeführt. Anschließend wurden die generierten fcs-Dateien des RETI-Kanals mithilfe der Software „WinMDI“ analysiert. Dabei wurden anhand des morphologischen Erscheinungsbildes der Scattergramme mehrere Gates generiert. Ein erstes Gate erfasst die Gesamtheit der Thrombozytenpopulation und ein weiteres die retikulierten Thrombozyten. Dieses schließt Thrombozyten, die eine höhere Absorption aufweisen, unabhängig von ihrer Größe ein.

Bei der Überprüfung auf Übereinstimmung zwischen den Methoden zur r-PLT-Bestimmung des Sysmex XT-2000iV zu der des ADVIA 120/2120 ergab sich eine schlechte Korrelation der Methoden. Der Spearman-Korrelationskoeffizient nahm Werte zwischen 0,55 und 0,60 an. Die mittlere Abweichung („bias“) ist mit Werten zwischen -0,6 und 1,5 zwar nicht hoch, jedoch weist sie eine große Spannbreite auf. Beispielsweise befindet sie sich bei dem Vergleich zwischen der Messung mit dem XT-2000iV-Gate nach Oellers et al. und der Messung mit dem ADVIA 120/2120 in einem Bereich zwischen -7,8 und 6,6. Diese schlechte Übereinstimmung erscheint nachvollziehbar, wenn man sich den methodischen Unterschied beider Messverfahren vor Augen führt. So verwenden beispielsweise beide Geräte mit Oxazin 750 und Ret Search(II) unterschiedliche Färbelösungen. Die Färbelösung des Sysmex-Gerätes, Ret Search (II), enthält einen Polymethin-Farbstoff und ein Oxazin. Diese Farbstoffe durchdringen die Zellmembran und färben so die RNA der retikulierten Thrombozyten und Retikulozyten an (Briggs et al., 2004). Es ist davon auszugehen, dass durch die verschiedene Zusammensetzung der Farbstoffe beider Geräte ein unterschiedliches Absorptions- bzw. Fluoreszenzverhalten auftritt. Darüber hinaus kommt es durch den Gebrauch der fixen Gates bei einigen Proben zu einem „Abschneiden“ der retikulierten Thrombozyten oder fälschlichem Zählen der Retikulozyten als retikulierte Thrombozyten, sodass es teilweise zu erheblichen Diskrepanzen zwischen den Zahlenwerten kommt. Die unten stehende Abbildung 28 verdeutlicht dies. Die gegenüber stehenden Scattergramme des XT-2000iV und ADVIA 120/2120 gehören zu derselben Blutprobe. Das erste Scattergramm-Paar zeigt eine gute Position des ADVIA-Gates und eine gute Übereinstimmung der prozentualen r-PLT-Werte. Darunter ist ein Scattergramm zu sehen, für welches das r-PLT-Gate des ADVIA 120/2120 idealerweise kleiner sein sollte, da das fixe Gate fälschlicherweise auch Retikulozyten erfasst. So kommt es zu dem falsch hohen r-PLT-Wert des ADVIA 120/2120. Das letzte Scattergramm zeigt eine Messung, bei der das fixe Gate

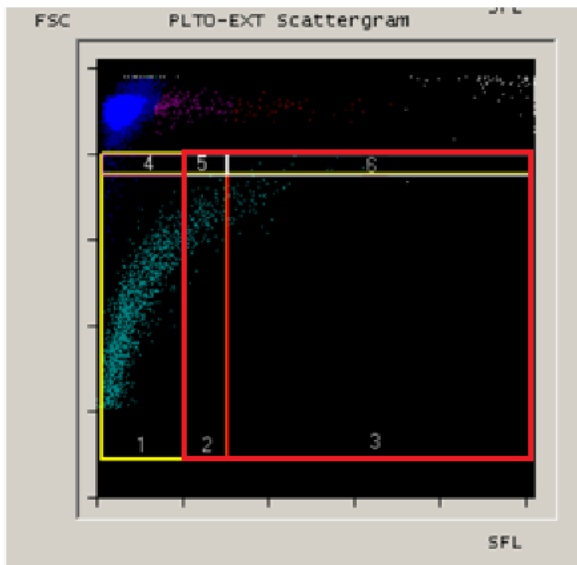
nicht alle retikulierten Thrombozyten erfasst und somit auch einen zu kleinen Zahlenwert angibt. Dieses Problem könnte minimiert werden, wenn das Gate automatisch an der jeweiligen Erythrozyten- und Thrombozytenpopulation ausgerichtet werden würde, was sich durch das Programmieren eines entsprechenden Algorithmus erreichen ließe. So würde das r-PLT-Gate anhand der Position der Populationen entlang der y-Achse verschoben werden.

Eine hohe Variabilität ist ein bereits bekanntes Problem der Thrombozytenmessung, welches höchstwahrscheinlich auch bei diesem Methodenvergleich zum Tragen kommt. Überdies ist zu bedenken, dass ebenso schon der XT-2000iV Schwächen bei der r-PLT-Bestimmung aufweisen kann. Er zeigte bei dem Methodenvergleich mit der Durchflusszytometrie, bei der die Zellen mit Thiazol Orange und CD61-Antikörpern markiert wurden, einen Korrelationskoeffizienten von 0,71 (Pankraz et al., 2009). Die Schwachstelle der automatischen Hämatologiegeräte gegenüber der Messung mittels Durchflusszytometrie besteht hier mit Sicherheit in der fehlenden spezifischen Anfärbung der Thrombozyten, wie es durch spezifische Antikörper möglich ist. Für die Scattergramme der mittels Durchflusszytometrie dargestellten Thiazol-Orange-markierten Zellen wurde bereits gezeigt, dass sich die Events retikulierter Thrombozyten mit denen der Retikulozyten überlagern und nur durch ein spezifisches Markieren eindeutig zu identifizieren sind (Ivory et al., 2007). Dies ist beim Einsatz automatischer Hämatologiesysteme nicht möglich und stellt daher eine zu bedenkende Fehlerquelle dar. Summieren sich nun die methodischen Schwächen von XT-2000iV und ADVIA 120/2120, so kann es durchaus zu einer schlechten Korrelation zwischen diesen beiden Geräten kommen. Ferner wiesen lediglich 30 der untersuchten Proben bei der Messung mit dem XT-2000iV r-PLT-Werte über 8,54 % auf, wovon nur 17 einen r-PLT-Wert von mindestens 12,8 % hatten. Somit ist der Anteil der Hunde mit erhöhter r-PLT-Zahl in der untersuchten Population eher gering, was auch einen Einfluss auf das Ergebnis der Korrelationsberechnung hat.

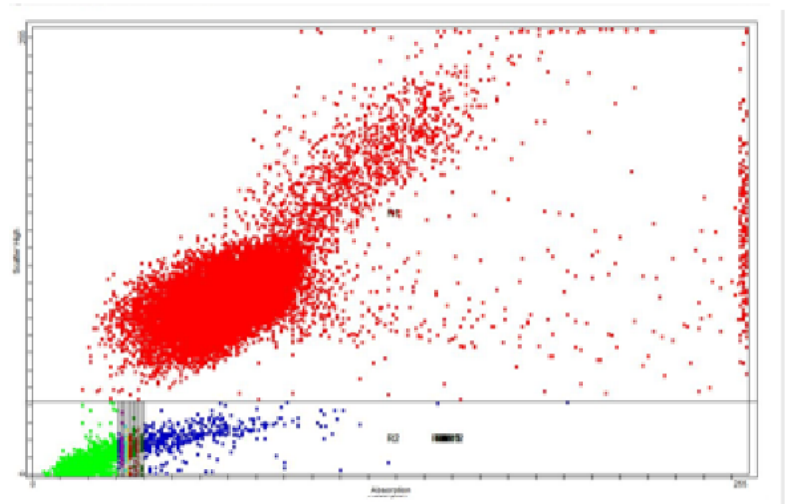
Abbildung 28; Darstellung des Problems der fixen Gates, das ideale manuelle Gate beim ADVIA 120/2120 ist blau dargestellt: Die gegenüberliegenden Scattergramme zeigen die Messungen derselben Probe mit den beiden verschiedenen Geräten Sysmex XT-2000iV und ADVIA 120/2120. Das obere Scattergrammpaar gehört zu einer Probe mit einer guten Übereinstimmung der r-PLT-Werte der beiden Geräte. Das fixe Gate des ADVIA 120/2120 hat eine optimale Position. Bei der nächsten dargestellten Probe kommt es zu einer Diskrepanz in den Messergebnissen. Das fixe Gate des ADVIA ist hier zu groß. Es erfasst daher fälschlicherweise Retikulozyten, was zu einem falsch hohen r-PLT-Wert führt. Das optimale Gate wäre kleiner (blau). Bei der untersten Probe erfasst der ADVIA zu wenige r-PLT, verglichen mit dem XT-2000iV. Das fixe Gate ist zu klein, sodass retikulierte Thrombozyten der Zählung entgehen. Das optimale Gate wäre deutlich größer (blau).

Sysmex XT-2000iV

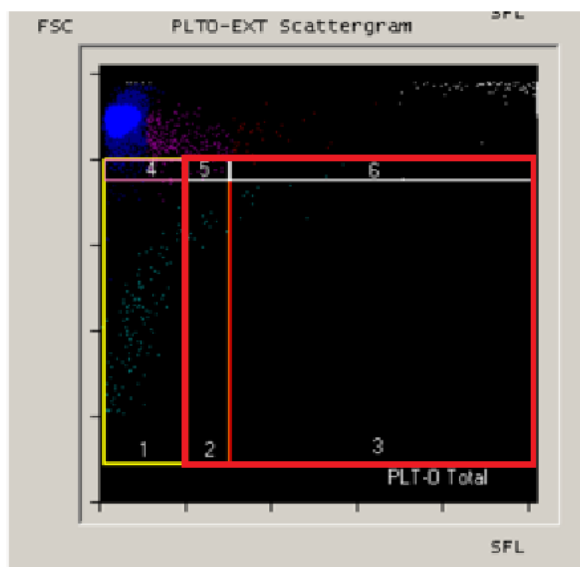
ADVIA 120/2120



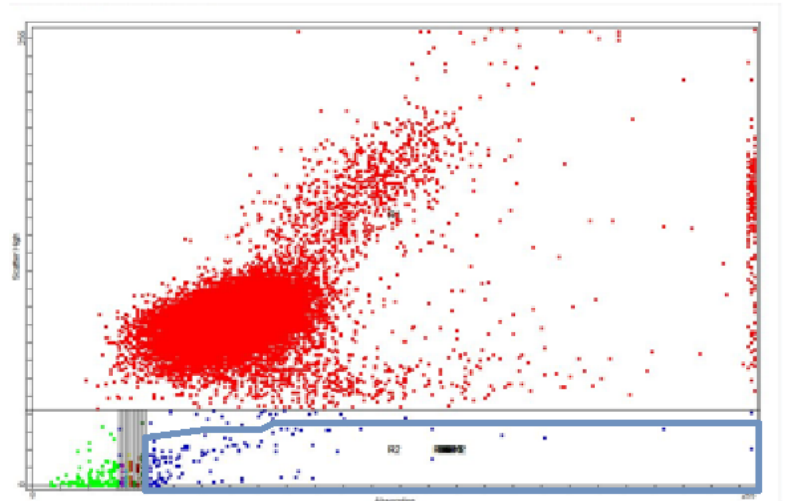
XT: 12,83 %



ADVIA: 17,52 %



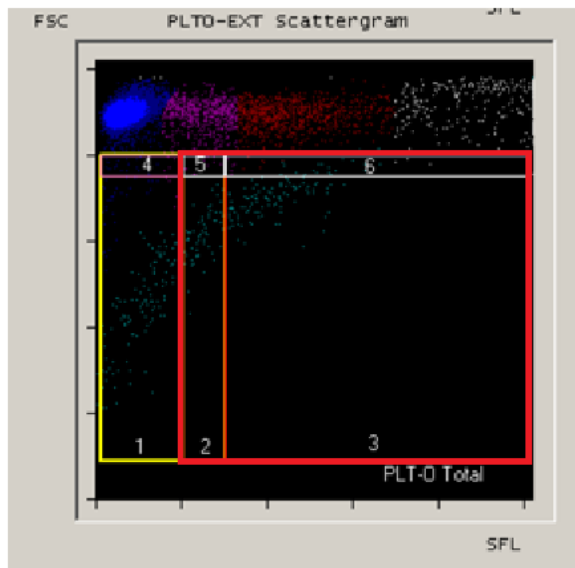
XT: 14,4 %



ADVIA: 42,07 %

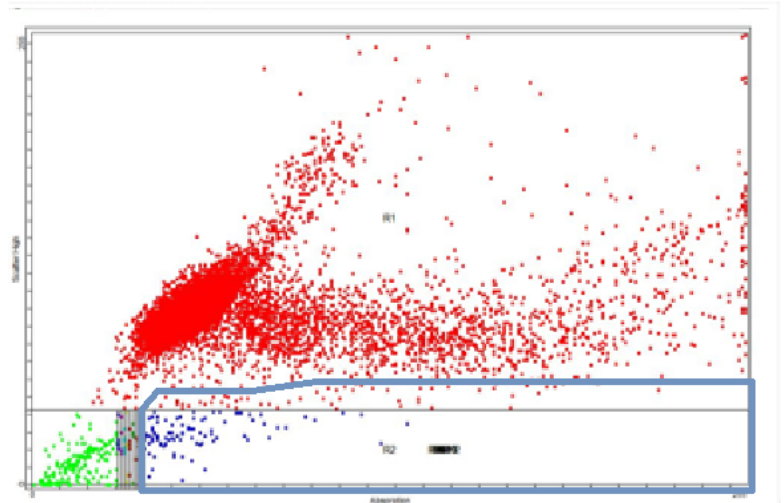
Fortsetzung der Abbildung auf Seite 99

Sysmex XT-2000iV



XT: 54,89 %

ADVIA 120/2120



ADVIA: 28,74 %

Zu weiteren Abklärung, ob es eine Übereinstimmung zwischen den Methoden des XT-2000iV und ADVIA 120/2120 gibt, wurden ROC-Kurven angefertigt. Die Methoden der r-PLT-Bestimmung mit dem XT-2000iV nach Gelain et al., Pankraz et al. und Oellers et al. dienten hierbei als Referenzmethode. Die errechnete „area under the curve“ nahm für den Vergleich der relativen r-PLT-Zahlenwerte des ADVIA 120/2120 mit denen der unterschiedlichen XT-2000iV-Gates Werte zwischen 0,892 und 0,903 an. Laut der AUC und der ROC-Kurve besitzt die Methode des ADVIA 120/2120 folglich eine gute Trennschärfe. Werden die einzelnen ROC-Kurven miteinander verglichen, unterscheiden sich diese nicht signifikant. Da bei der r-PLT-Messung nach Oellers et al. die wenigsten Interferenzen auftreten, wird im weiteren Verlauf des Methodenvergleichs diese Methode als Referenzmethode für die r-PLT-Messung des ADVIA herangezogen.

Im nächsten Schritt wurden Sensitivität und Spezifität für verschiedene Cut-Offs errechnet. Als Grundlage der Berechnung der Cut-Off-Werte, die hier zuerst aufgeführt sind, dienten die maximalen Referenzwerte. Außerdem wurde aufgrund der hohen Varianz der Methode ebenfalls der CV miteinbezogen. Ausgehend von einem maximalen Referenzwert von 6,9 % und einem CV von 35,64 % ergab sich damit für den ADVIA 120/2120 ein Cut-Off von 9,36 %. Für den XT-2000iV („Oellers“-Gate) beträgt dieser Cut-Off 8,54 %, ausgehend von einem Referenzwert von 7,0 % und einem CV von 22,04 %. Für diese Cut-Offs beträgt die Sensitivität

50,00 % und die Spezifität 99,10 %. Die Sensitivität ist somit mäßig, während der ADVIA 120/2120 hier eine sehr gute Spezifität beweist.

Ist die Fragestellung für den Einsatz des ADVIA 120/2120 jedoch, ob eine deutlich gesteigerte Nachbildung der Thrombozyten vorliegt, kann ein höherer Cut-Off-Wert für den XT-2000iV gewählt werden. Bei einem gleichbleibendem Cut-Off des ADVIA 120/2120 von 9,36 % und einem höheren Cut-Off des XT-2000iV-Werts von 12,80 %, ergeben sich eine Sensitivität von 76,47 % und eine Spezifität von 99,13 %. Somit besitzt der ADVIA 120/2120 sowohl eine hohe Sensitivität, als auch eine hohe Spezifität, um einen hohen Anteil retikulierter Thrombozyten zu detektieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es aufgrund des niedrigen Korrelationskoeffizienten nicht empfehlenswert ist, bei klinischen Fragestellungen den reinen Zahlenwert des ADVIA 120/2120 zu beurteilen. Es besteht ein unsicherer Bereich, da der ADVIA 120/2120 Proben, die beim XT-2000iV r-PLT-Werte zwischen 8,54 % und 12,80 % besitzen, nicht eindeutig als solche mit erhöhten r-PLT-Werten erkennt. Bei einem deutlichen Anstieg des r-PLT-Anteils beim XT-2000iV von über 12,80 %, kann man jedoch sicher sein, auch beim ADVIA 120/2120 ein erhöhtes Ergebnis zu erhalten. Empfehlenswert ist hierbei sicherlich der Einsatz von Warnsignalen (Flags). Der Graubereich ist für den Bereich zwischen dem oberen Referenzwert von 6,9 % und einem Wert von 9,36 % für den ADVIA 120/2120 zu bestimmen, da in solch einer Probe schon retikulierte Thrombozyten vorliegen können und das Ergebnis daher zu prüfen ist. Ein weiteres Signal (Flag) wäre sinnvoll, um den Untersucher auf einen sicher hohen r-PLT-Anteil ab einem Wert von 9,36 % hinzuweisen. Des Weiteren empfiehlt sich eine Plausibilitätsprüfung des entsprechenden Scattergramms. So kann eine mögliche Fehlmessung in Folge einer schlechten Trennung der Populationen aufgrund des fixen Gates aufgedeckt werden.

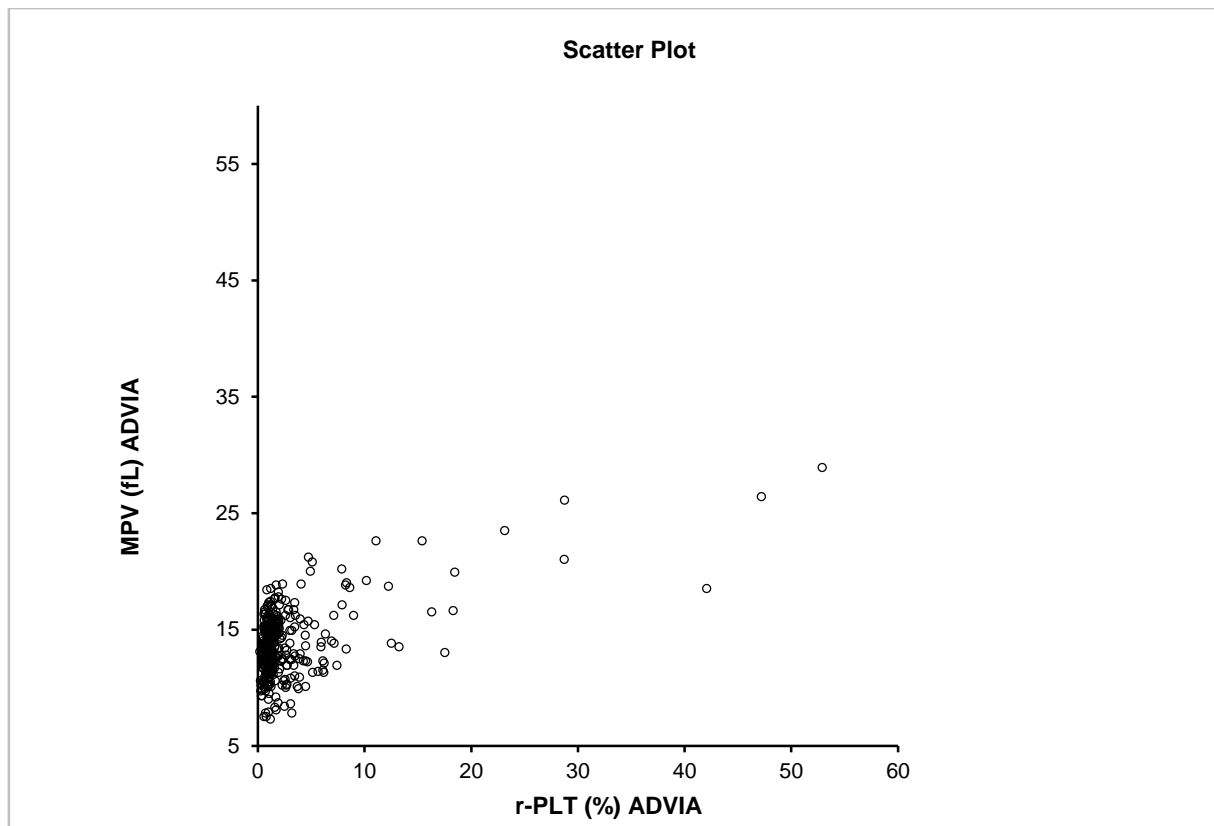
Die hier gewählten Cut-Offs sind Hypothesen, die in klinischen Studien geprüft werden sollten und deren Einsatz bei klinischen Fragestellungen dann zu bewerten ist.

5.3 Retikulierte Thrombozyten und Thrombozytenindizes

Der Zusammenhang zwischen einer verstärkten Thrombozyten-Nachbildung und der Thrombozytengröße des Hundes ist bisher unzureichend geklärt und wird kontrovers diskutiert (Tvedten, 2009). Bis heute kann zu diesem Thema keine fundierte Aussage getroffen werden, da verschiedene Autoren wie beispielsweise Dircks et al. und Sullivan et al. zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen (Dircks et al., 2009; Sullivan et al., 1995).

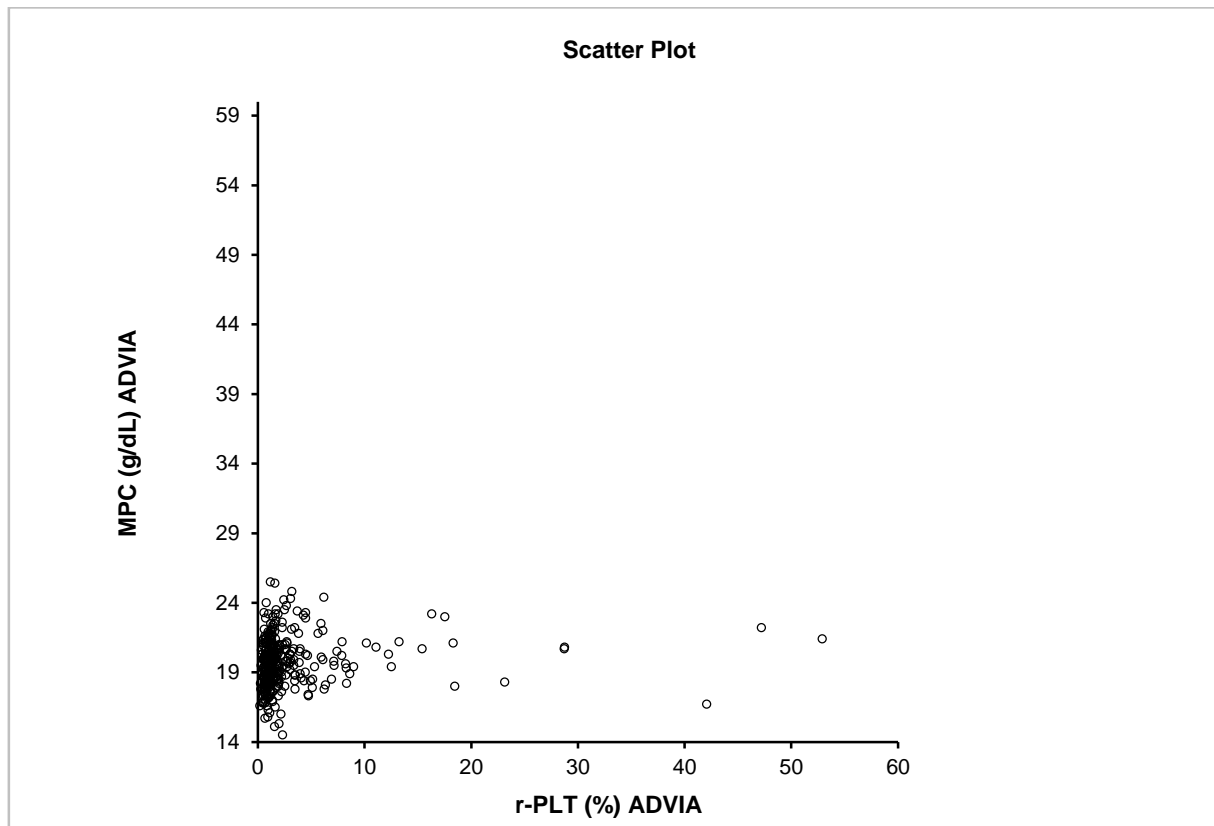
Betrachtet man die Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenindizes des ADVIA 120/2120, so fällt für die meisten Indizes ein niedriger Korrelationskoeffizient auf. Für die Parameter MPV, PDW und Large PLT, welche die Thrombozytengröße betreffen, nimmt er Werte zwischen -0,13 und 0,25 an. Somit ist für den ADVIA 120/2120 zu sagen, dass mit diesem Gerät nicht lediglich große Thrombozyten als retikulierte Thrombozyten gemessen werden. Stattdessen handelt es sich um zwei voneinander unabhängige Parameter, die nicht miteinander korrelieren. Die Thrombozytenindizes MPV, PDW und Large PLT eignen sich also zudem keinesfalls als Ersatz für die Messung der retikulierten Thrombozyten. Es ist folglich nicht davon auszugehen, dass sich anhand der Thrombozytengröße eine Aussage über die Thrombopoeseleistung und die Ätiologie einer Thrombozytopenie treffen lässt.

Abbildung 29; Spearman-Korrelation für den Vergleich der Parameter r-PLT (%) und MPV (fL) des ADVIA 120/2120, n = 362: Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt 0,25. Es handelt sich um zwei voneinander unabhängige Parameter. Der Parameter MPV ist folglich kein Ersatz für die Messung retikulierter Thrombozyten.



Auch besteht kein Zusammenhang zwischen der Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile und retikulierten Thrombozyten. Die Parameter MPC und PCDW zeigen niedrige Korrelationskoeffizienten von 0,24 und -0,10 für die Korrelation zum r-PLT-Anteil. Die Thrombozytenparameter, die sich auf die Thrombozytenmasse beziehen, müssen differenziert betrachtet werden. Zwar ist für die Indizes PCT und MPM keine Korrelation zum r-PLT-Wert erkennbar, doch ist der Korrelationskoeffizient für den Parameter PMDW mit einem Wert von 0,71 höher. Bei der Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse kann folglich von einer mäßigen Korrelation gesprochen werden.

Abbildung 30; Spearman-Korrelation für den Vergleich der Parameter r-PLT (%) und MPC (g/dL) des ADVIA 120/2120, n = 362: Der Spearman-Korrelationskoeffizient beträgt 0,24. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile und retikulierten Thrombozyten.



Auf den ersten Blick scheint beim XT-2000iV eine Korrelation zwischen dem r-PLT-Anteil und den Thrombozytenindizes MPV, P-LCR und PDW mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,52 und 0,65 vorhanden zu sein. Diese Zahlen sind jedoch nur bedingt aussagekräftig. Bei 42 der 362 Blutproben gab der XT-2000iV keine Werte zu den Thrombozytenindizes an. Auch Bourgès-Abella et al. und Serra et al. berichten von fehlenden Thrombozytenparametern bei 6 bzw. 7 Tieren ihrer Studien (Bourgès-Abella et al., 2011; Serra et al., 2012). Auch Pankraz et al. erhielten bei 10 von 18 Tieren der Patientengruppe keine Werte zu den Thrombozytenindizes (Pankraz et al., 2009). Laut Herstellerangaben werden keine Werte zu den Parametern angegeben, wenn ein Analysefehler vorliegt (Sysmex Corporation, 2012). Dies kann der Fall sein, wenn das Gerät bei der Impedanzmessung nicht eindeutig zwischen der Population der Thrombozyten und der Erythrozyten trennen kann. Diese Einstellung der Sysmex-Geräte ist durchaus sinnvoll, da die Thrombozytenindizes in Fällen von Interferenzen nicht eindeutig nur den Thrombozyten zuzurechnen sind. Bei den im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Analysen

fiel in Fällen mit fehlenden Thrombozytenindizes oft ein wenig ausgeprägtes Tal zwischen den Populationen auf (siehe Abbildung 31).

Abbildung 31; PLTO-Scattergramm und PLT-Histogramm einer Probe mit fehlenden Werten der Thrombozytenindizes und einem r-PLT-Wert von 12,83 %: Es fällt der hohe r-PLT-Anteil im Scattergramm und das wenig ausgeprägte Tal zwischen den Populationen im PLT-Histogramm auf. Dieses Phänomen war oft bei Proben mit fehlenden Thrombozytenindizes zu beobachten.

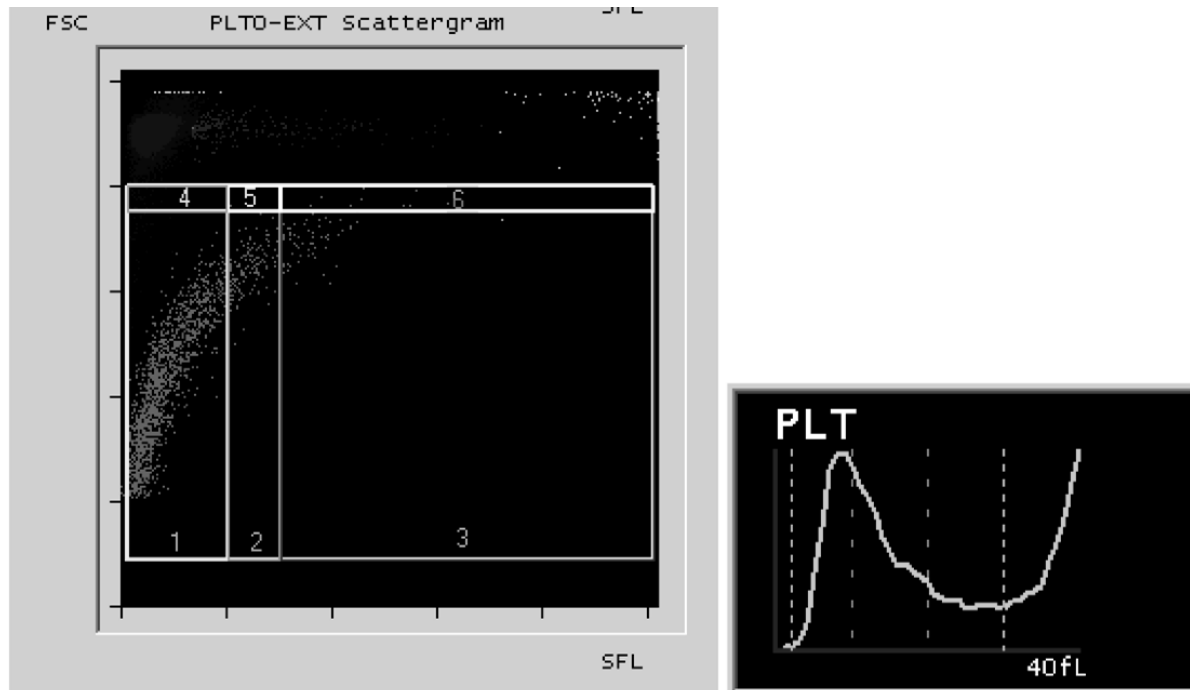
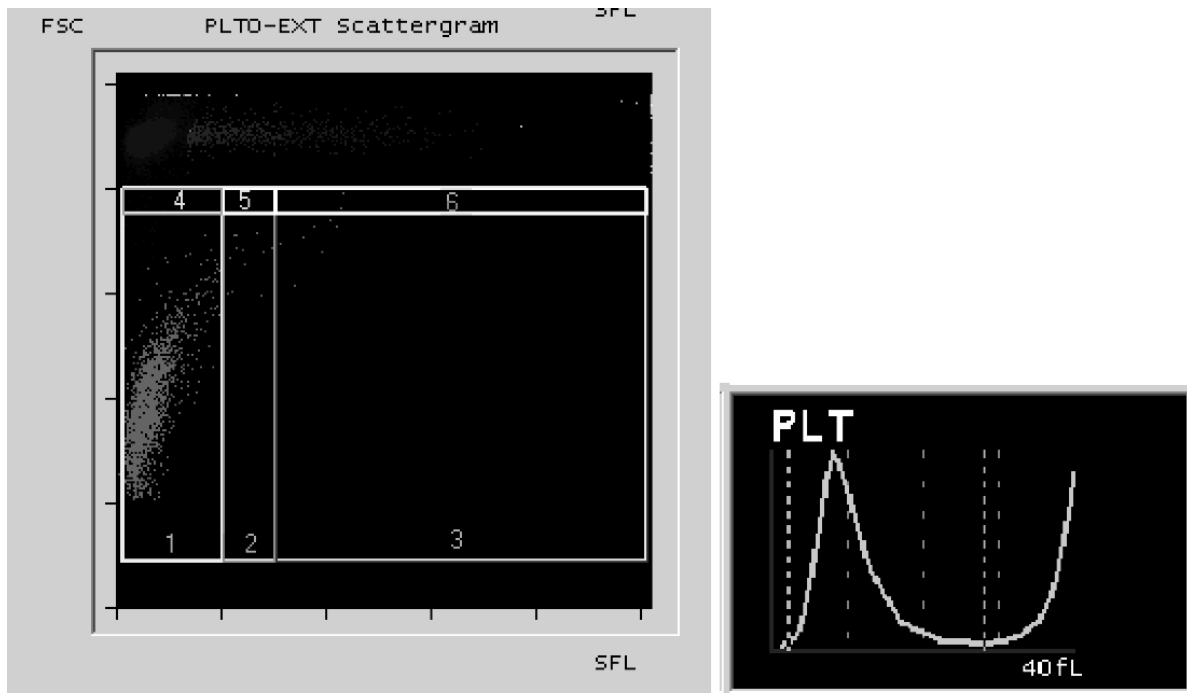


Abbildung 32; PLTO-Scattergramm und PLT-Histogramm einer Probe mit angegebenen Werten der Thrombozytenindizes und einem r-PLT-Wert von 1,07 %: Im Vergleich zu der vorherigen Abbildung ist bei dieser Probe, die einen geringen r-PLT-Anteil aufweist, gut die Trennung der Populationen im PLT-Histogramm zu erkennen.



Auffällig ist, dass der XT-2000iV bei den hier untersuchten Proben grundsätzlich ab einem r-PLT-Wert von 11,66 % (Oellers-Gate) keine Werte für die Thrombozytenparameter angegeben hat. Somit eignen sich die hier ermittelten Korrelationskoeffizienten nicht, um den Zusammenhang zwischen dem r-PLT-Wert und den Thrombozytenindizes zu bewerten. Die Schlussfolge aus dieser Beobachtung ist jedoch, dass sich auch die Thrombozytenindizes des XT-2000iV nicht als Ersatz für die r-PLT-Messung eignen, da sie bei hohen r-PLT-Werten nicht vorliegen.

Schon bei einem anderen Sysmex-Gerät, dem NE-8000, beobachteten Ogura et al. die fehlende Ausgabe der Thrombozytenindizes bei niedrigen Thrombozytenzahlen. So fehlten die Werte bei 48 % der Proben mit Thrombozytenzahlen unter $50 \times 10^9/l$ und bei 23 % der Fälle mit Thrombozytenzahlen zwischen 50 und $100 \times 10^9/l$ (Ogura et al., 1995). Bowles et al. berichten von einem Anstieg des mittels Impedanzverfahren gemessenen MPV über die Zeit. So nimmt der MPV im Schnitt schon nach 30 Minuten um 7,9 % zu und steigt innerhalb von 6 Stunden um 11,2 % (Bowles et al., 2005). Dies soll durch das Schwellen der Thrombozyten in EDTA bedingt sein (Briggs et al., 2009). Da die in dieser Arbeit ausgewerteten Proben teilweise nicht

unmittelbar nach Blutentnahme gemessen wurden, kann eine solche Veränderung des MPV hier nicht ausgeschlossen werden.

Wird der MPV optisch bestimmt, soll es zu einem zeitabhängigen Abfall des MPVs kommen, der mit dem Verdünnen der Zytoplasmabestandteile und einer dadurch veränderten Lichtstreuung zusammenhängt (Patterson, 1997). Es ist folglich zu bedenken, dass dieses Phänomen die schlechte Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenindizes des ADVIA 120/2120 erklären kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass aufgrund der gewonnenen Ergebnisse keine Korrelation zwischen der Thrombozytengröße und dem Anteil retikulierter Thrombozyten besteht. Somit eignen sich die betreffenden Thrombozytenindizes nicht als Ersatz der r-PLT-Messung. Es kann beim Hund folglich keine Aussage über die Ätiologie einer Thrombozytopenie anhand der Thrombozytengröße getroffen werden. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen von Bommer et al. Sie zeigten, dass MPV und PDW nicht zur klinischen Interpretation einer Thrombozytopenie beitragen können. Aus der Humanmedizin ist jedoch bekannt, dass anhand der retikulierten Thrombozyten eine Aussage über die Thrombozytenbildung getroffen werden kann (Abe et al., 2006; Kienast und Schmitz, 1990). Dass der neue Parameter r-PLT dazu auch beim Hund in der Lage ist, muss noch in weiteren klinischen Studien geprüft werden.

5.4 Absolute oder relative r-PLT-Werte

Mit dem XT-2000iV und dem ADVIA 120/2120 können sowohl prozentuale als auch absolute r-PLT-Werte ermittelt werden. Pankraz et al. beschränkten sich in dem Vergleich zur durchflusszytometrischen Analyse mit Thiazol Orange auf die relativen Werte (Pankraz et al., 2009). Gelain et al. gaben sowohl relative als auch absolute Werte an (Gelain et al., 2010a). Für die Humanmedizin wurde ebenfalls die Verwendung beider Werte beschrieben. Briggs et al. sind der Meinung, dass der Einsatz absoluter r-PLT-Werte bei niedrigen Thrombozytenzahlen limitiert ist, da hier die absoluten Werte selbst dann noch niedrig sind, wenn die relativen Werte auf 100 % zugehen (Briggs et al., 2006). Genau dies halten Ruisi et al. jedoch für eine mathematische Verfälschung des Wertes und befürworten daher den absoluten r-PLT-Wert (Ruisi et al., 2010). Natürlich muss bei extrem niedrigen absoluten Thrombozytenzahlen in Kombination mit hohen relativen r-PLT-Werten bedacht werden, dass die Thrombozytenpopulation hier überwiegend aus retikulierten Thrombozyten besteht. Es ist also noch nicht zu einem Altern dieser Zellen gekommen, was auf einen extremen Verbrauch bzw. Zerstörung hindeuten kann. Pankraz et al. zeigten mit dem XT-2000iV bei einem Hund mit immunvermittelter Thrombozytopenie, dass einer Zunahme der Thrombozytenzahl ein Anstieg der prozentualen r-PLT-Zahl vorausgeht (Pankraz et al., 2009). Während hier die Thrombozytenzahl anstieg, nahm der Anteil der retikulierten Thrombozyten an der gesamten Thrombozytenpopulation stetig ab. Dies ist auf die Alterung der Thrombozyten und die daraus folgende Durchmischung der Population zurückzuführen. Auch der ADVIA 120/2120 eignet sich bestens für das Monitoring eines Patienten mit Thrombopenie. Die gespeicherten Rohdaten des von Pankraz et al. publizierten Patienten wurden ebenfalls im Laufe dieser Arbeit analysiert. Zwei dieser hämatologischen Messungen sind in der vorliegenden Studie integriert. Die weiteren Verlaufsmessungen mit dem ADVIA 120/2120 wurden separat im Anschluss analysiert. Dieser Patient wurde seit Vorstellung in der Kleintierklinik Gießen kontinuierlich labordiagnostisch überwacht. Er wies eine immunvermittelte Thrombozytopenie auf, die nach Vorstellung mit Immunsuppressiva behandelt wurde. Die Untersuchung des Knochenmarks zeigte eine einsetzende Megakaryopoese. Bei der Analyse der ADVIA 120/2120-Messungen zeigte sich ebenfalls der schon beschriebene zeitliche Verlauf der r-PLT-Werte und Thrombozytenzahl (Abbildung 33). Auch hier ging der Anstieg der prozentualen r-PLT-Zahl deutlich dem Anstieg der Thrombozytenzahl voraus. Dies zeigt, dass auch die Messung des r-PLT-Anteils mit dem ADVIA 120/2120 eine Aussage über die Regeneration der Thrombozytenzahl liefert.

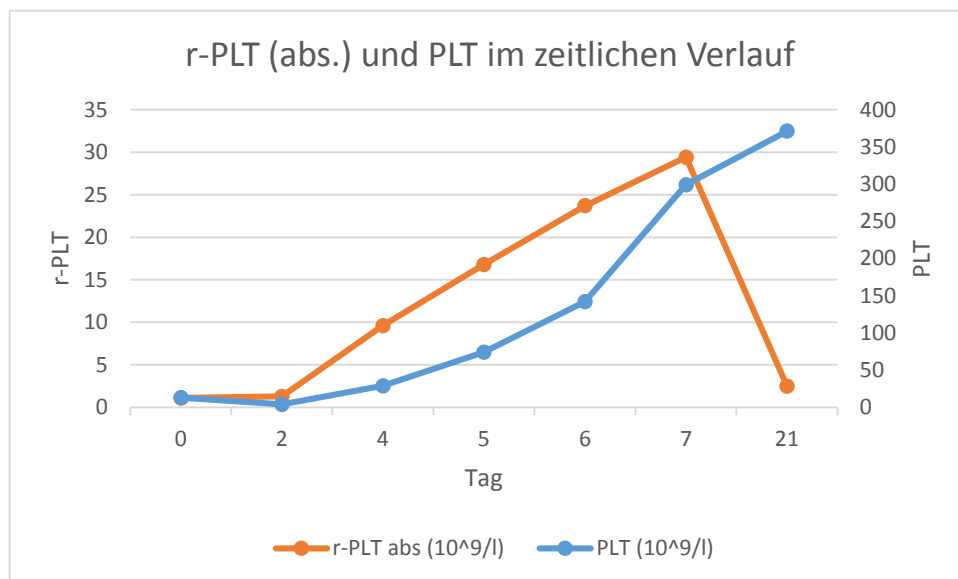
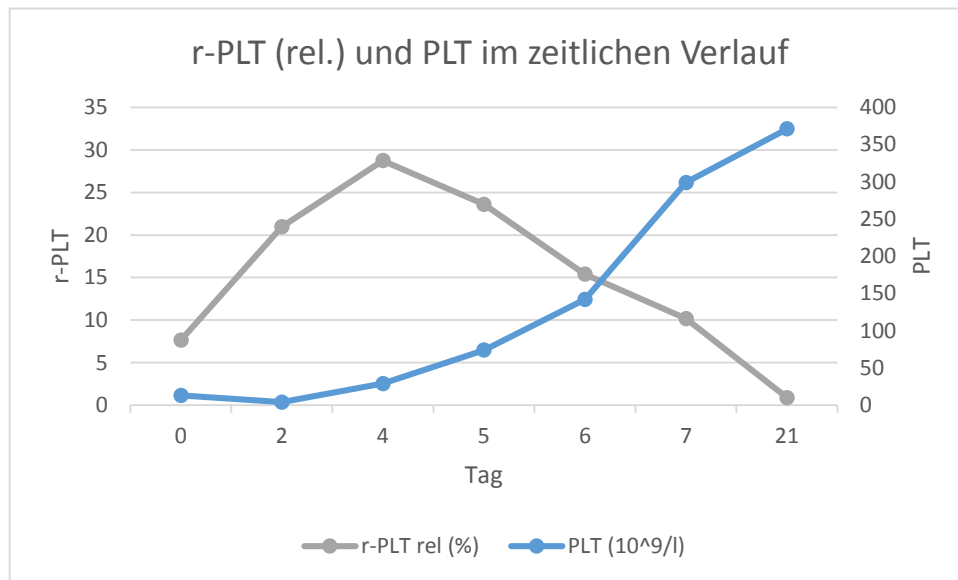
Die Dauer zwischen dem Auftreten des relativen r-PLT-Gipfels und dem ausreichenden Anstieg der Thrombozytenzahl betrug mehr als zwei Tage, wobei ein deutlicher Anstieg der Thrombozytenzahl schon vorher zu beobachten war. Saigo et al. beobachteten bei humanen Patienten mit r-PLT-%-Spitzenwerten über 10 % einen deutlich schnelleren Anstieg der Thrombozytenzahl, als bei Patienten mit niedrigeren r-PLT-Werten der Fall war. Die Dauer zwischen dem r-PLT-Gipfel und dem Anstieg der Thrombozytenzahl betrug hier durchschnittlich 3 statt 6,7 Tage (Saigo et al., 2008). Für den Hund ist dies noch zu zeigen.

Wie schon beschrieben, wird die Aussagekraft der absoluten r-PLT-Zahl vor allem bei niedrigen Thrombozytenzahlen kontrovers diskutiert. Laut Ault et al. muss bei sehr niedrigen Thrombozytenzahlen und geringen absoluten r-PLT-Werten nicht zwingend eine verminderte Thrombopoese ursächlich sein. Stattdessen kann dies durch die kurze Lebensspanne der Thrombozyten bedingt sein (Ault, 1993). So wurden für Patienten mit aktiver thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP) oder idiopathischer thrombozytopenischer Purpura (ITP) hohe relative r-PLT-Werte, aber niedrige absolute r-PLT-Werte beschrieben. Briggs et al. führen dies auf die geringe Thrombozytenzahl zurück und schlussfolgern, dass die relativen Werte bessere Informationen liefern (Briggs et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde dies lediglich bei einer Messung beobachtet. Hier lag der absolute r-PLT-Wert im Referenzbereich, während sich der relative r-PLT-Wert mit 14,4 % (XT „Gelain“) bzw. 15,19 % (XT „Oellers“) deutlich oberhalb des Referenzbereichs befand. Die Thrombozytenzahl war hierbei zudem mit $13 \times 10^9/l$ sehr niedrig. Bei deutlich mehr Proben befand sich jedoch der absolute r-PLT-Wert außerhalb des Referenzbereichs, obwohl die relative r-PLT-Zahl nicht erhöht war. Dies ist auf die hohe Zahl adulter Thrombozyten zurückzuführen.

Ault et al. demonstrierten bei Mäusen den unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der absoluten und relativen r-PLT-Werte. Noch bevor sich die Thrombozytenzahl erholte, wurde dies durch einen Anstieg der relativen r-PLT-Zahl angekündigt. Das absolute r-PLT-Level blieb jedoch vermindert, bis sich die Thrombozytenzahl signifikant steigerte. Stabilisierte sich später die Thrombozytenzahl, fielen sowohl relative als auch absolute r-PLT-Werte wieder ab (Ault et al., 1992). Dieses Verhalten ließ auch bei dem erwähnten Patienten der vorliegenden Studie beobachten. Auch hier ging bei der Messung mit dem ADVIA 120/2120 der Anstieg der prozentualen r-PLT-Zahl dem Anstieg der Thrombozytenzahl deutlich voraus. Der absolute r-PLT-Wert stieg erst, als sich auch die Thrombozytenzahl erholte (Abbildung 33). Somit kam es zu einem deutlich zeitlich versetzten Anstieg von relativem und absolutem r-PLT-Wert. Nachfolgend fielen hier der absolute und relative r-PLT-Wert wieder ab, als die Thrombozytenzahl ausreichend hoch war.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der relative r-PLT-Wert eine höhere Aussagekraft zu haben scheint. Der klinische Nutzen des Wertes besteht unter anderem darin, Rückschlüsse auf einen zu erwartenden Anstieg der Thrombozytenzahl zu ermöglichen. Da der Anstieg des relativen r-PLT-Wertes deutlich vor einem Anstieg des absoluten r-PLT-Wertes und der Thrombozytenzahl zu beobachten ist, ist er der präferierte Parameter. Der klinische Nutzen beim Hund ist in weiteren Studien zu prüfen.

Abbildung 33; labordiagnostische Verlaufskontrolle eines Patienten mit immunmediierter Thrombopenie mit dem ADVIA 120/2120: Der prozentuale r-PLT-Anstieg geht deutlich dem Anstieg der Gesamthrombozytenzahl voraus. Folglich eignet sich die r-PLT(%) -Messung des ADVIA bei diesem Patienten, um auf die zu erwartende Veränderung der Gesamthrombozytenzahl zu schließen. Der Anstieg der absoluten r-PLT-Zahl geht mit dem Anstieg der Gesamthrombozytenzahl einher, statt diesem vorauszugehen. Eine Aussage über die zukünftige Entwicklung der PLT-Gesamtzahl bietet die absolute r-PLT-Zahl daher nicht.



5.5 Referenzwerte

5.5.1 Referenzwerte der Messung retikulierter Thrombozyten

Die Bestimmung retikulierter Thrombozyten des Hundes mithilfe des Sysmex XT-2000iV ist erst seit 2009 beschrieben, weshalb in der Literatur nur begrenzt Angaben zu Referenzwerten zu finden sind. Der Parameter r-PLT des ADVIA 120/2120 wird mit dieser Arbeit zum ersten Mal überhaupt publiziert, weshalb die ermittelten Referenzwerte hier mit denen anderer Geräte verglichen werden. Vergleichswerte liegen aus den Veröffentlichungen von Pankraz et al. und Gelain et al. für die Messung mit dem Sysmex XT-2000iV vor (Pankraz et al., 2009; Gelain et al., 2010a). Darüber hinaus werden die von Smith et al., Weiss et al. und Hanahachi et al. publizierten Referenzwerte der r-PLT-Messung beim Hund mittels Durchflusszytometrie aufgeführt (Smith und Thomas, 2002; Weiss und Townsend, 1998; Hanahachi et al., 2001).

Es fällt auf, dass sich die verglichenen Referenzwerte für die Messung der retikulierten Thrombozyten stark unterscheiden. Ein entscheidender Faktor hierbei ist mit Sicherheit die verwendete Methode. So ist davon auszugehen, dass sich die Methoden von ADVIA 120/2120, XT-2000iV und dem Durchflusszytometer beispielsweise in den Faktoren Färbelösung, Färbezeit und der Fähigkeit, unterschiedliche Zellpopulationen zu trennen, unterscheiden. Ein Aspekt ist hier die bessere Trennung von Erythrozyten und Thrombozyten bzw. Retikulozyten und retikulierten Thrombozyten durch den Einsatz von thrombozytenspezifischen Antikörpern beim Durchflusszytometer. Aber auch Methoden, die auf dem gleichen Gerät basieren, weisen unterschiedliche Referenzwerte auf. So sind die von Pankraz et al. veröffentlichten Referenzwerte mit $0,56 \pm 0,82 \%$ deutlich niedriger im Vergleich zu denen von Gelain et al. mit $1,4 \pm 0,7 \%$ (Pankraz et al., 2009; Gelain et al., 2010a). Auch bei den Referenzwerten der vorliegenden Arbeit, die nach diesen Methoden generiert wurden, wird dies deutlich. Hier liegt das Referenzintervall des Gates nach Pankraz et al. bei $0,0 - 1,2 \%$, während nach der Gelain-Methode mit einem Intervall von $0,2 - 3,7 \%$ deutlich höhere relative r-PLT-Werte ermittelt wurden. Die Diskrepanz ist hier eindeutig mit der unterschiedlichen Gate-Setzung zu erklären. Das Gate nach Pankraz et al. bezieht deutlich weniger Zellen mit ein, da es, verglichen mit dem Gelain-Gate, erst Zellen mit einer stark erhöhten Fluoreszenz erfasst.

Tabelle 22; Vergleich der aktuellen Referenzwerte für die r-PLT-Messung mit den aus der Literatur bekannten Angaben

Parameter	Einheit	95%-Referenzintervall, Eigene Werte (n = 193)	Pankraz et al. (n = 40)	Gelain et al. (n = 86)	Smith et al. (n = 36)	Weiss et al. (n = 20)	Hanahachi et al. (n = 8)
r-PLT	%	ADVIA 120/2120	0,56 ± 0,82	1,4 ± 0,7	1,9 ± 1,2	9,3 ± 2,7 ¹	3,4 ± 2,0 ¹
		XT-2000iV nach Gelain et al.					
		XT-2000iV nach Pankraz et al.					
		XT-2000iV nach Oellers et al.					
r-PLT	10 ⁹ /l	ADVIA 120/2120	-	4 ± 2,5	5,225 ± 3,435	31,18 ± 9,7 ¹	-
		XT-2000iV nach Gelain et al.					
		XT-2000iV nach Pankraz et al.					
		XT-2000iV nach Oellers et al.					

¹ gemessen in thrombozytenreichem Plasma (platelet-rich plasma)

5.5.2 Referenzwerte der Thrombozytenparameter des ADVIA 120/2120

Angaben zu Referenzwerten der Thrombozytenparameter bei ADVIA 120/2120 und XT-2000iV sind in der Literatur rar gesät bzw. sind in den betreffenden Veröffentlichungen nicht alle Parameter aufgeführt (Tvedten et al., 2012; Weiss und Wardrop, 2010b; Moritz, 2000; Bourguès-Abella et al., 2011; Serra et al., 2012). Diese Arbeit soll dazu beitragen, dem Untersucher Referenzwerte der Thrombozytenindizes zur Verfügung zu stellen. Für die Werte des ADVIA 120/2120 sind Vergleichswerte in den Arbeiten von Dircks et al., Moritz und Tvedten et al. zu finden. Tvedten et al. bezogen sich hierbei auf eine Population, die sich aus Labrador Retrievern, Boxern und Dachshunden zusammensetzte. Die ermittelten Referenzwerte sind laut den Autoren nur für den Vergleich innerhalb ihrer Studie geeignet (Tvedten et al., 2012). Auch Dircks et al. generierten die Referenzwerte für den MPV zu diesem Zweck (Dircks et al., 2009). Die einzigen für den Einsatz bei veterinärmedizinischen Fragestellungen geeigneten Referenzwerte liefert die Arbeit von Moritz (Moritz, 2000). Für den ausführlichen Vergleich sind dennoch alle gefundenen Werte aufgeführt.

Tabelle 23; Vergleich der aktuellen Referenzwerte der mit dem ADVIA 120/2120 bestimmten Thrombozytenparameter mit den aus der Literatur bekannten Angaben

Parameter	Einheit	95%- Referenzintervall Eigene Werte (n= 193)	Moritz (n = 46)	Tvedten et al. (n = 66)	Dircks et al. (n > 100)
PLT	10 ⁹ /l	182,7 – 448,1	173,1 – 486,5	156 – 394	–
MPV	fl	8,9 – 18,4	8,6 – 14,4	8,6 – 14,5	8,1 – 14,3
PDW	%	53,0 – 73,0	55,7 – 66,9	–	–
PCT	%	0,2 – 0,6	0,3 – 0,5	0,18 – 0,43	–
MPC	g/dl	16,8 – 23,5	14,60 – 18,64	–	–
PCDW	g/dl	4,4 – 8,7	4,58 – 7,06	–	–
MPM	pg	1,7 – 2,7	1,3 – 1,9	–	–
PMDW	pg	0,6 – 1,0	0,5 – 0,8	–	–
Large PLTs	10 ⁹ /l	9,7 – 97,8	6,6 – 84,2	–	–
RBC Ghosts	10 ¹² /l	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0	–	–
RBC Fragments	10 ¹² /l	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0	–	–
% PLT Clumps	%	0,4 – 5,2	0,0 – 4,46	–	–
# PLT Clumps	Number (Events)	33,9 – 460,7	0,0 – 301,2	–	–

Die hier verglichenen Referenzwerte für den ADVIA 120/2120 stimmen gut überein. Geringe Abweichungen können auf die Unterschiede in den untersuchten Populationen und gerätespezifischen Einstellungen zurück zu führen sein.

5.5.3 Referenzwerte der Thrombozytenparameter des Sysmex XT-2000iV

Die hier ermittelten Referenzwerte für den Sysmex XT-2000iV werden mit den von Bourgès-Abella et al. und Serra et al. veröffentlichten Werten verglichen. Bourgès-Abella et al. betrachteten hier eine Hundepopulation unterschiedlicher Altersklassen und verschiedener Rassen, die in Frankreich typischerweise gehalten werden (Bourgès-Abella et al., 2011). Zu der von Serra et al. untersuchten Population ist zu sagen, dass nur mittelgroße und große Hunde jüngerer Alters einbezogen wurden, die zudem über 25 kg wogen (Serra et al., 2012).

Tabelle 24; Vergleich der aktuellen Referenzwerte der mit dem Sysmex XT-2000iV bestimmten Thrombozytenparameter mit den aus der Literatur bekannten Angaben

Parameter	Einheit	95%-Referenzintervall Eigene Werte (n= 190 – 193)	Serra et al. (n = 160 – 182)	Bourgès-Abella et al. (n = 126 – 132)
MPV	fl	8,6 – 12,5	9,8 – 14,0	9,05 – 12,68
PCT	%	0,2 – 0,4	0,14 – 0,38	0,14 – 0,61
P-LCR	%	14,1 – 43,0	22,9 – 54,1	16,13 – 49,16
PDW	fl	8,8 – 16,6	11,1 – 20,8	9,30 – 18,95
PLT-I	10 ⁹ /l	161,8 – 425,0	–	64 – 613
PLT-O	10 ⁹ /l	150,9 – 397,5	102 – 282	108 – 562

Überwiegend zeigen die Referenzwerte auch hier eine gute Übereinstimmung. Auffällig ist jedoch das unterschiedliche Referenzintervall der Thrombozytenzahl. Dies kann auf die unterschiedliche Patientenauswahl bzw. die untersuchte Population zurückzuführen sein.

Insgesamt fallen des Öfteren Unterschiede zwischen den Referenzwerten der unterschiedlichen Hundepopulationen dieser Arbeit auf. So liegt das 95%-Referenzintervall der r-PLT-Messung des ADVIA 120/2120 bei den Hunden verschiedener Rassen (siehe Tabelle 19) bei 0,3 bis 6,9 %. Für die Beagle-Population (siehe Tabelle 16) ergibt sich ein deutlich engeres Intervall von 0,5 bis 3,5 %. Auch bei anderen Parametern lässt sich dies beobachten. Folglich stellt die hohe Anzahl der Beagle, bezogen auf die Gesamtpopulation, eine Limitierung der an allen gesunden Tieren errechneten Referenzwerte dar. Ein wahrscheinlicher Grund für die unterschiedlichen Referenzwerte sind Faktoren wie die Rasse der Tiere und ihre Haltungsbedingungen. So sind

Haustiere deutlich mehr Umweltfaktoren ausgesetzt als kontrolliert gehaltene Beagle. Auch ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass ein privat gehaltener Hund subklinische Infektionen oder andere Erkrankungen aufweist, die bei der klinischen Untersuchung nicht zu bemerken waren, jedoch das Blutbild verändern. Zusätzlich unterscheiden sich die untersuchten Gruppen deutlich in Bezug auf das Alter der Tiere. Die untersuchten Beagle waren zwischen 10 und 14 Monaten alt. Das Alter der Hunde der anderen Rassen lag zwischen 3 Monaten und 16 Jahren. Auch der Trainingszustand ist zu berücksichtigen, wie Sassnau für Thrombozytenzahl und MPV zeigte. So haben trainierte Huskys eine signifikant höhere Thrombozytenzahl sowie ein signifikant kleineres Thrombozytenvolumen (MPV) (Sassnau, 2007). Diese Unterschiede sind bei der Bewertung von r-PLT-Werten und Thrombozytenindizes anhand der hier aufgeführten Referenzwerte zu bedenken.

Die Wahl des betreffenden Referenzintervalls richtet sich nach der jeweiligen Fragestellung. So eignen sich die anhand der gesamten gesunden Population ermittelten Referenzwerte für Fragestellungen in der tierärztlichen Praxis. Für Laboratorien dürften die enger gefassten Referenzwerte der Beagle-Population von größerer Bedeutung sein.

6 Zusammenfassung

Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung der Messung retikulierter Thrombozyten mit dem Sysmex XT-2000iV und die Gateoptimierung anhand verschiedener in der Literatur publizierter Gates (Gelain et al., 2010a; Pankraz et al., 2009), die Neuentwicklung der r-PLT-Messung für den ADVIA 120/2120 sowie die Erstellung von Referenzwerten. Weiterhin wird der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenindizes für beide Geräte untersucht und Referenzwerte werden erstellt.

Material und Methoden

Retrospektiv wurden die gespeicherten Rohdaten von 362 Hundeblutproben hinsichtlich ihres r-PLT-Anteils und der Thrombozytenindizes analysiert. Das Erstellen eines Gates für die r-PLT-Messung erfolgte beim XT-2000iV mittels der geräteeigenen Software und beim ADVIA 120/2120 mit einer kostenfreien Software zur Analyse von Durchflusszytometrie-Daten (WinMDI 2.9). Als Vergleichsmethode für die neu erstellten Gates des XT-2000iV dienten die bereits aus der Literatur bekannten Gates des XT-2000iV. Für die neu entwickelte Methode der r-PLT-Messung mithilfe des ADVIA 120/2120 diente vor allem das optimierte Gate nach Oellers et al. als Vergleich.

Für beide Geräte erfolgte die Berechnung der Präzision innerhalb der Serie. Zur statistischen Auswertung des Methodenvergleichs dienten Spearman-Korrelationskoeffizient, die Bland-Altman-Analyse und die Passing-Bablok-Regression. Außerdem wurden ROC-Kurven erstellt und Cut-Off-Werte mit Sensitivität und Spezifität für die r-PLT-Messung ermittelt. Der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern wurde anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten beurteilt. Die Referenzwerterstellung erfolgte unter Einbeziehung aller gesunden Tiere und zusätzlich separat für die Population der kontrolliert gehaltenen Beagle.

Ergebnisse

Die Präzision innerhalb der Serie ergab beim ADVIA 120/2120 für die Thrombozytenindizes PLT, MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM und PMDW niedrige Variationskoeffizienten in einem Bereich von 1,03 bis 7,32 %. Die Parameter Large PLTs, RBC Ghosts und RBC Fragments zeigten eine hohe Variation mit Koeffizienten zwischen 17,78 und 29,50 %. Die Variationskoeffizienten für die Thrombozytenindizes des XT-2000iV befinden sich in einem moderaten Bereich zwischen 1,86 und 6,75 %. Bei beiden Geräten ist die Präzision innerhalb der Serie für die Messung retikulierter Thrombozyten gering. Beim ADVIA 120/2120 nehmen die Variationskoeffizienten für die prozentuale und absolute r-PLT-Zahl Werte von 35,64 bzw. 36,97 % an. Mit Werten zwischen 21,36 und 41,14 % ergibt sich beim XT-2000iV ein ähnlicher Bereich.

Die Korrelation zwischen den unterschiedlichen XT-2000iV-Gates war mit Korrelationskoeffizienten von 0,86 bis 1,00 hoch. Zwischen den r-PLT-Messungen beider Geräte war die Korrelation mit einem r_s von 0,60 als schlecht zu bezeichnen (r-PLT(XT-Gelain) zu r-PLT(ADVIA), Bias = -0,5 %; r-PLT(XT-Oellers) zu r-PLT(ADVIA), Bias = -0,6 %). Die Betrachtung der ROC-Kurven zeigte eine gute Trennschärfe für die r-PLT-Messung mit dem ADVIA 120/2120. Bei Cut-Offs von $r\text{-PLT(XT-Oellers)} \geq 12,80 \%$ und $r\text{-PLT(ADVIA)} \geq 9,36 \%$ ergab sich eine Sensitivität von 76,47 % und eine Spezifität von 99,13 % bezüglich der Feststellung eines deutlich erhöhten r-PLT-Wertes.

Bei der Betrachtung der Thrombozytenparameter korrelierte lediglich die Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse des ADVIA 120/2120 (PMDW) mit dem r-PLT-Anteil ($r_s = 0,71$).

Die 95%-Referenzintervalle der r-PLT-Messung des XT-2000iV betrugen 0,2 - 3,7 % bzw. $0,4 - 5,7 \times 10^9/l$ (r-PLT-Gate nach Gelain et al.), 0,0 - 1,2 % bzw. $0,1 - 2,1 \times 10^9/l$ (r-PLT-Gate nach Pankraz et al.) und 0,2 - 3,9 % bzw. $0,4 - 5,6 \times 10^9/l$ (r-PLT-Gate nach Oellers et al.). Für den r-PLT-Wert des ADVIA 120/2120 ergab sich ein Intervall von 0,5 - 6,1 % bzw. $1,3 - 10,9 \times 10^9/l$.

Schlussfolgerung

Die schlechte Korrelation der Methode des XT-2000iV zu der des ADVIA 120/2120 ist durch den Methodenunterschied zu erklären. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl das eigene Gate des XT-2000iV als auch die Messung mit dem ADVIA 120/2120 für die Analyse retikulierter Thrombozyten beim Hund geeignet sind. Dennoch sollte zur Interpretation das

entsprechende Scattergramm hinzu gezogen werden, um eine fehlerhafte Zellzählung aufgrund des fixen Gates bei der jeweiligen Probe auszuschließen.

Zusätzlich verdeutlichen die Ergebnisse, dass eine Zunahme der Thrombozytengröße nicht mit dem Anteil retikulierter Thrombozyten korreliert und folglich nicht für einen erhöhten Anteil juveniler Thrombozyten spricht.

Die erstellten Referenz- und Cut-Off-Werte bilden eine Grundlage, um die klinische Relevanz retikulierter Thrombozyten beim Hund in weiteren Studien zu beurteilen. Zudem liegen dem Untersucher nun Referenzwerte für alle Thrombozytenindizes beider Geräte vor.

7 Summary

Objective

The aim of this current study is to validate the measurement of reticulated platelets with the Sysmex XT-2000iV and to improve the applied gates on the basis of several published gates (Gelain et al., 2010a; Pankraz et al., 2009), to newly develop the method of measuring r-PLT utilizing the ADVIA 120/2120 and to provide reference values. Furthermore the association between r-PLT and platelet indices of both analyzers will be investigated and reference values will be established.

Materials and methods

The stored raw data of 362 canine blood samples were analyzed retrospectively. With the XT-2000iV the included software package was used to set gates for r-PLT-measurement, whereas for the ADVIA 120/2120 a freely available software for the analysis of flow cytometry data files was applied (WinMDI 2.9). As a reference for the newly developed gates of the XT-2000iV, already established gates for the XT-2000iV published by various authors were used. The newly developed method for r-PLT-measurement with the ADVIA 120/2120 was compared to the XT-2000iV with its newly optimized gate by Oellers et al.

For both analyzers intra-assay repeatability was determined. For statistical evaluation of method comparison Spearman's correlation coefficient, Bland-Altman analysis and Passing-Bablok regression were used. Furthermore, receiver operating characteristic (ROC) curves were created and cut-off values, including sensitivity and specificity for r-PLT measurement, were determined. The association between platelet indices and r-PLT was assessed through reference to the Spearman's correlation coefficient. The reference range was established taking into account the entire cohort of healthy dogs. In addition, a separate reference range was created using only the population of healthy Beagle dogs with defined housing conditions.

Results

The coefficient of variation (CV) of the parameters PLT, MPV, PDW, PCT, MPC, PCDW, MPM and PMDW of the ADVIA 120/2120 was low and ranged from 1.03 to 7.32 %. For the platelet

indices Large PLTs, RBC Ghosts and RBC Fragments the CV was high and ranged from 17.78 to 29.50 %. The platelet indices of the XT-2000iV showed moderate CVs with percentages between 1.86 and 6.75 %. For both analyzers intra-assay repeatability for measurement of reticulated platelets was low. CVs for percentage and absolute r-PLT count with the ADVIA 120/2120 ranged from 35.64 to 36.97 %. CVs for the XT-2000iV were similar with values between 21.36 and 41.14 %.

The correlation between the different XT-gates was high and showed coefficients of correlation between 0.86 and 1.00. The r-PLT measurements of both analyzers showed a poor correlation with an r_s of 0.60 (r-PLT(XT-Gelain) vs. r-PLT(ADVIA), bias = -0.5 %; r-PLT(XT-Oellers) vs. r-PLT(ADVIA), bias = -0.6 %). The ROC curve displayed a high discriminatory power for r-PLT measurement with the ADVIA 120/2120. With a cut-off value of r-PLT(XT-Oellers) \geq 12.80 % and r-PLT(ADVIA) \geq 9.36 % there was a sensitivity of 76.47 % and a specificity of 99.13 % regarding the identification of a clearly increased r-PLT value.

Concerning platelet indices only the platelet mass distribution width of the ADVIA 120/2120 (PMDW) correlated with the r-PLT percentage ($r_s = 0.71$).

The 95%-reference intervals of the r-PLT measurement with the XT-2000iV were 0.2 – 3.7 % or $0.4 - 5.7 \times 10^9/L$ (r-PLT(XT-Gelain)), 0.0 – 1.2 % or $0.1 - 2.1 \times 10^9/L$ (r-PLT(XT-Pankraz)) and 0.2 – 3.9 % or $0.4 - 5.6 \times 10^9/L$ (r-PLT(XT-Oellers)). For the r-PLT value of the ADVIA 120/2120 the interval was 0.5 – 6.1 % or $1.3 - 10.9 \times 10^9/L$, respectively.

Conclusion

The reason for the poor correlation between the method of the XT-2000iV and the ADVIA 120/2120 is in all probability the difference in methods. In conclusion, both the newly created gate for the XT-2000iV and the measurement with the ADVIA 120/2120 are capable of the analysis of reticulated platelets in dogs. Nevertheless, the corresponding scattergram should be consulted for interpretation of the results to eliminate false cell count caused by the fixed gate.

The results also illustrate that an increase in platelet size does not correlate with the percentage of reticulated platelets and can therefore not be used as an indicator for an increased amount of juvenile platelets.

The rendered reference intervals and cut-off values are a foundation for future studies to assess the clinical relevance of reticulated platelets in dogs. Furthermore, investigators now have reference intervals for both analyzers at their disposal.

8 Literaturverzeichnis

Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T (2006): A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 118: 463–469.

Ault KA (1993): Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *Ann NY Acad Sci* 677: 293–308.

Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS (1992): The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol* 98: 637–646.

Balduini CL, Noris P, Spedini P, Belletti S, Zambelli A, Da Prada GA (1999): Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Brit J Haematol* 106: 202–207.

Bertazzolo W, Comazzi S, Sesso L, Scarpa P, Ru G, Paltrinieri S (2007): Comparison of methods for determining platelet numbers and volume in cavalier King Charles spaniels. *J Small Anim Pract* 48: 556–561.

Bommer NX, Shaw DJ, Milne EM, Ridyard AE (2008): Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. *J Small Anim Pract* 49: 518–524.

Bourgès-Abella N, Geffré A, Concordet D, Braun J, Trumel C (2011): Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Vet Clin Path* 40: 303–315.

Bowles KM, Cooke LJ, Richards EM, Baglin TP (2005): Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clin Lab Haematol* 27: 370–373.

Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ (2006): Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion Med* 16: 101–109.

Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ (2004): Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Brit J Haematol* 126: 93–99.

Briggs C, Mellors I, Roderick A, Ward A, O'Malley C, Barker J, De La Salle B, McTaggart P, Hyde K, Machin SJ (2009): Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int Jnl Lab Hem* 31: 277–297.

- Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Paniccia R, Romano E, Gensin GF, Abbate R, Gori AM (2008):** Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemostasis* 99: 930–935.
- Cesari F, Marcucci R, Gori AM, Caporale R, Fanelli A, Casola G, Balzi D, Barchielli A, Valente S, Giglioli C, Gensini GF, Abbate R (2013):** Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. *Thromb Haemostasis* 109: 846–853.
- Dale GL, Friese P, Hynes LA, Burstein SA (1995):** Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood* 85: 1822–1825.
- Davis B, Toivio-Kinnucan M, Schuller S, Boudreaux MK (2008):** Mutation in β 1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles spaniels. *J Vet Intern Med* 22: 540–545.
- De Blasi RA, Cardelli P, Costante A, Sandri M, Mercieri M, Arcioni R (2012):** Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intens Care Med* 39: 636–643.
- Di Mario A, Garzia M, Leone F, Arcangeli A, Pagano L, Zini G (2009):** Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *J Infection* 59: 201–206.
- Dircks BH, Schuberth H, Mischke R (2009):** Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004–2006). *J Am Vet Med Assoc* 235: 960–966.
- Dunker C (2011):** Evaluation der Hämatologiesysteme Sysmex pocH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Hund. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- Friedrichs K, Barnhart K, Blanco J, Freeman K, Harr K, Szladovits B, Walton R (2011):** Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS). Guidelines for the determination of reference intervals in veterinary species and other related topics: SCOPE. American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).
- Gelain E, Tutino G, Rossi G, Bertazzolo W (2010a):** High fluorescent platelets fraction in macrothrombocytopenic Norfolk terrier. 20th ECVIM-CA Annual Congress, Toulouse.

Gelain ME, Bertazzolo W, Tutino G, Pogliani E, Cian F, Boudreaux MK (2012): A novel point mutation in the β 1-tubulin gene in asymptomatic macrothrombocytopenic Norfolk and Cairn terriers. ISACP Congress Ljubljana 2012, Ljubljana.

Gelain ME, Tutino GF, Pogliani E, Bertazzolo W (2010b): Macrothrombocytopenia in a group of related Norfolk terriers. *Vet Rec* 167: 493–494.

Guthikonda S, Lev EI, Patel R, Delao T, Bergeron AL, Dong JF, Kleiman NS (2007): Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost* 5: 490–496.

Hanahachi A, Moritomo T, Kano R, Watari T, Tsujimoto H, Hasegawa A (2001): Thiazole orange-positive platelets in healthy and thrombocytopenic dogs. *Vet Rec* 149: 122–123.

Harrison P, Goodall AH (2008): “Message in the Platelet” – more than just vestigial mRNA! *Platelets* 19: 395–404.

Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, Machin SJ (1997): Reticulated platelets. *Platelets* 8: 379–383.

Hennel E, Kentouche K, Beck J, Kiehntopf M, Boeer K (2012): Immature platelet fraction as marker for platelet recovery after stem cell transplantation in children. *Clin Biochem* 45: 749–752.

Ingram M, Coopersmith A (1969): Reticulated platelets following acute blood loss. *Brit J Haematol* 17: 225–229.

Ivory K, Sarria B, Fairweather-Tait SJ, Hughes DA (2007): Reticulated platelets interfere with flow cytometric reticulocyte counts. *Int Jnl Lab Hem* 29: 352–360.

Joseph J, Harrison P, Mackie I, Machin SJ (1998): Review: Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Lupus* 7: S48–S51.

Joutsu-Korhonen L, Sainio S, Riikonen S, Javela K, Teramo K, Kekomäki R (2000): Detection of reticulated platelets: estimating the degree of fluorescence of platelets stained with thiazole orange. *Eur J Haematol* 65: 66–71.

Jung H, Jeon H, Kim H, Kim S (2010): Immature Platelet Fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med* 30: 451–459.

Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Shivdasani RA, von Andrian UH (2007): Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317: 1767–1770.

Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E, Matsumoto K, Hirata R, Domitsu K, Kobayashi M (2005): Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Brit J Haematol* 128: 698–702.

Karpatkin S (1972): Human platelet senescence. *Annu Rev Med* 23: 101–128.

Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ (2006): A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 125: 282–287.

Kieffer N, Guichard J, Farcet J, Vainchenker W, Breton-Gorius J (1987): Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 164: 189–195.

Kienast J, Schmitz G (1990): Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 75: 116–121.

Lee LG, Chen C, Chiu LA (1986): Thiazole orange: A new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 7: 508–517.

Lilliehöök I, Tvedten H (2009): Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet Clin Path* 38: 163–174.

Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2001): Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *J Cell Biol* 154: 485–490.

Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DCS, Kile BT (2007): Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128: 1173–1186.

McDonald TP, Odell TT, Gosslee DG (1964): Platelet size in relation to platelet age. *P Soc Exp Biol Med* 115: 684–689.

McRedmond JP, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ (2004): Integration of proteomics and genomics in platelets. A profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics* 3: 133–144.

Meyer K (2005): Softwareadaptation und Evaluation des ADVIA(TM) 120 bei der Tierart Katze. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen, Klinik für Kleintiere, Innere Medizin und klinische Laboratoriumsdiagnostik, Dissertation.

Michelson AD (2012): Platelets. 2. Megakaryocyte development and platelet formation. Elsevier Science, 3. Aufl.

Michimoto T, Okamura T, Suzuki K, Watari T, Kano R, Hasegawa A (2004): Thiazole orange positive platelets in a dog with Evans' syndrome. J Vet Med Sci 66: 1305–1306.

Michur H, Maślanka K, Szczepiński A, Mariańska B (2008): Reticulated platelets as a marker of platelet recovery after allogeneic stem cell transplantation. Int Jnl Lab Hem 30: 519–525.

Monteagudo M, Amengual MJ, Munoz L, Soler JA, Roig I, Tolosa C (2008): Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. Q J Med 101: 549–555.

Moritz A (2000): Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen, Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik, Innere Krankheiten der Kleintiere, Habilitation.

Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K, Failing K, Weiss DJ (2004): Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. Vet Clin Path 33: 32–38.

Moritz A, Walcheck BK, Weiss DJ (2005): Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. Am J Vet Res 66: 325–329.

Nakagawa J (2010): Evaluation der Hämatologiesysteme Sysmex pocH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Katze. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen, Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere, Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik, Dissertation.

Nakamura T, Uchiyama S, Yamazaki M, Okubo K, Takakuwa Y, Iwata M (2002): Flow cytometric analysis of reticulated platelets in patients with ischemic stroke. Thromb Res 106: 171–177.

Northern J, Tvedten HW (1992): Diagnosis of microthrombocytosis and immune-mediated thrombocytopenia in dogs with thrombocytopenia – 68 cases (1987 – 1989). J Am Vet Med Assoc 200: 368–372.

Ogura M, Yasuno M, Kobayashi Y, Tsukada T (1995): Clinical significance of platelet volume indices estimated by automated blood cell analyzer. *Rinsho Byori* 43: 385–390.

O'Malley CJ, Rasko JEJ, Bassar RL, McGrath KM, Cebon J, Grigg AP, Hopkins W, Cohen B, O'Byrne J, Green MD, Fox RM, Berndt MC, Begley CG (1996): Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation. *Blood* 88: 3288–3298.

Pabla R, Weyrich AS, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1999): Integrin-dependent control of translation: Engagement of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ regulates synthesis of proteins in activated human platelets. *J Cell Biol* 144: 175–184.

Pankraz A, Bauer N, Moritz A (2009): Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. *Vet Clin Path* 38: 30–38.

Pankraz A, Ledieu D, Pralet D, Provencher-Bolliger A (2008): Detection of reticulated platelets in whole blood of rats using flow cytometry. *Exp Toxicol Pathol* 60: 443–448.

Patterson K (1997): (Zit. nach Briggs, 2009) Platelet parameters generated by automated blood counters. *CME Bull Haematology* 1: 13–16.

Peng JP, Friese P, Heilmann E, George JN, Burstein SA, Dale GL (1994): Aged platelets have an impaired response to thrombin as quantitated by P-selectin expression. *Blood* 83: 161–166.

Rieger MA, Schroeder T (2007): Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen. *BIOspektrum* 13: 254–256.

Robinson MSC, Mackie IJ, Khair K, Liesner R, Goodall AH, Savidge GF, Machin SJ, Harrison P (1998): Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Brit J Haematol* 100: 351–357.

Robinson MSC, Mackie IJ, Machin SJ, Harrison P (2000): Two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol* 22: 211–213.

Rowan RM, Linssen J (2005): A picture is worth a thousand words. *Sysmex Journal International*: 27–32.

- Ruisi MM, Psaila B, Ward MJ, Villarica G, Bussel JB (2010):** Stability of measurement of the immature platelet fraction. *Am J Hematol* 85: 622–624.
- Russell KE, Perkins PC, Grindem CB, Walker KM, Sellon DC (1997):** Flow cytometric method for detecting thiazole orange-positive (reticulated) platelets in thrombocytopenic horses. *Am J Vet Res* 58: 1092–1096.
- Saigo K, Sakota Y, Masuda Y, Matsunaga K, Takenokuchi M, Nishimura K, Sugimoto T, Sakurai K, Hashimoto M, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Nomura T, Kubota Y, Kumagai S (2008):** Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients. *Transfus Apher Sci* 38: 127–132.
- Salvagno GL, Montagnana M, Degan M, Marradi PL, Ricetti MM, Riolfi P, Poli G, Minuz P, Santonastaso CL, Guidi G (2006):** Evaluation of platelet turnover by flow cytometry. *Platelets* 17: 170–177.
- Santoro SK, Garrett LD, Wilkerson MJ (2007):** Platelet concentrations and platelet-associated IgG in Greyhounds. *J Vet Intern Med* 21: 107–112.
- Sassnau R (2007):** Veränderungen des Blutbildes bei Siberian Huskys in Abhängigkeit vom Trainingszustand. *Tierarztl Prax* 35: 375–380.
- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey TV (1998):** European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemostasis* 79: 885–896.
- Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH, Shivdasani RA (2001):** A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol* 11: 579–586.
- Schwertz H, Koster S, Kahr WHA, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, Blaylock RC, Kraiss LW, Greinacher A, Zimmerman GA, Weyrich AS (2010):** Anucleate platelets generate progeny. *Blood* 115: 3801–3809.
- Serra M, Freeman KP, Campora C, Sacchini F (2012):** Establishment of canine hematology reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer using a blood donor database. *Vet Clin Path* 41: 207–215.
- Siemens (2005):** ADVIA® 2120 Hematology System Bedienungsanleitung V. 2.00.00.
- Siemens (2009):** ADVIA® 2120i/2120/120 Trainingshandbuch, Revision: 2.

Smith R, Thomas JS (2002): Quantitation of reticulated platelets in healthy dogs and in nonthrombocytopenic dogs with clinical disease. *Vet Clin Path* 31: 26–32.

Sullivan PS, Manning KL, McDonald TP (1995): Association of mean platelet volume and bone marrow megakaryocytopoiesis in thrombocytopenic dogs: 60 cases (1984 - 1993). *J Am Vet Med Assoc* 206: 332–334.

Sysmex Corporation (2012): Software of automated hematology analyzer for animal, XT-2000iV/XT-1800iV, instructions for use, Japan.

Thon JN, Macleod H, Begonja AJ, Zhu J, Lee K, Mogilner A, Hartwig JH, Italiano JE (2012): Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun* 3: 852.

Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, Larson MK, Hoffmeister K, Hartwig JH, Italiano JE (2010): Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* 191: 861–874.

Tvedten HW (2009): Interpretation of platelet test results in diagnosis. The 19th Annual ECVIM Congress, Porto, Portugal.

Tvedten HW, Lilliehöök IE, Hillström A, Häggström J (2008): Plateletcrit is superior to platelet count for assessing platelet status in Cavalier King Charles Spaniels. *Vet Clin Path* 37: 266–271.

Tvedten HW, Lilliehöök IE, Öberg J, Häggström J, Höglund K, Ljungvall I (2012): Validation of Advia plateletcrit for assessing platelet mass in dogs, including Cavalier King Charles Spaniels. *Vet Clin Path* 41: 336–343.

Weiss DJ, Townsend E (1998): Evaluation of reticulated platelets in dogs. *Comp Haematol Int* 8: 166–170.

Weiss DJ, Wardrop KJ (2010a): Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition, Chapter 77. Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. Wiley-Blackwell, 6. Aufl., Ames, Iowa, USA.

Weiss DJ, Wardrop KJ (2010b): Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition, Chapter 9. Thrombopoiesis. Wiley-Blackwell, 6. Aufl., Ames, Iowa, USA.

Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1998): Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *P Natl Acad Sci Usa* 95: 5556–5561.

Wilkerson MJ, Shuman W, Swist S, Harkin K, Meinkoth J, Kocan AA (2001): Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Vet Clin Path* 30: 141–149.

Zucker ML, Murphy CA, Rachel JM, Martinez GA, Abhyankar S, McGuirk JP, Reid KJ, Plapp FV (2006): Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. *Laboratory Hematology* 12: 125–130.

9 Abkürzungen

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AA	aplastische Anämie
ACS	acute coronary syndrome (akutes Koronarsyndrom)
ADP	Adenosindiphosphat
ADVIA	Siemens ADVIA 120/2120
ASVCP	American Society of Veterinary Clinical Pathology
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve (Fläche unterhalb der ROC-Kurve)
CBC	complete blood count (kleines Blutbild)
CD	cluster of differentiation
CHCMr	corpuscular hemoglobin concentration mean - reticulocytes (mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten)
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein-Diacetat
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
DIC	disseminated intravascular coagulation (disseminierte intravasale Koagulopathie)
DIFF	Leukozyten-Differenzierung
DMS	demarkierendes Membransystem
DNA	desoxiribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiaminessäure)

fl	Femtoliter
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GM- CSF	granulocyte-monocyte colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
HCT	Hämatokrit
HDWr	hemoglobin distribution width – reticulocytes (Hämoglobinverteilungsbreite der Retikulozyten)
HFPP	high fluorescent platelet fraction (Fraktion der hochfluoreszierenden Thrombozyten)
HFR	high fluorescence ratio (Anteil der Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz, niedriger Reifungsgrad)
HGB	Hämoglobinbestimmung
H-IPF	highly fluorescent immature platelet fraction (Fraktion der in hohem Maße fluoreszierenden unreifen Thrombozyten)
ICU	intensive care unit (Intensivstation)
IL	Interleukin
IPF	immature platelet fraction (Fraktion der unreifen Thrombozyten)
IRF	immature reticulocyte fraction (Fraktion der unreifen Retikulozyten)
ITP	idiopathische thrombozytopenische Purpura
kg	Kilogramm
Kl.BB	kleines Blutbild
l	Liter
LFR	low fluorescence ratio (Anteil der Retikulozyten mit niedriger Fluoreszenz, hoher Reifungsgrad)
LPLT	large platelets (große Thrombozyten > 20 fl)
MCH	mean corpuscular hemoglobin (mittlere Hämoglobinkonzentration der Einzelerythrozyten)

MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration (mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten)
MCVr	mean corpuscular volume - reticulocytes (mittleres Zellvolumen der Retikulozyten)
MFR	medium fluorescence ratio (Anteil der Retikulozyten mit mittlerer Fluoreszenz, mittlerer Reifungsgrad)
MGDF	megakaryocyte growth and development factor
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPC	mean platelet concentration (mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile)
MPM	mean platelet mass (mittlere Thrombozytenmasse)
MPV	mean platelet volume (mittleres Zellvolumen der Thrombozyten)
mRNA	messenger-ribonucleid acid (Messenger-Ribonukleinsäure)
N	Chromosomensatz
n	Patientenzahl
nm	Nanometer
p	Signifikanz
PCDW	platelet concentration distribution width (Verteilungsbreite der mittleren Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile)
PCT	plateletcrit (Thrombokrit)
PDW	platelet distribution width (Verteilungsbreite des Thrombozytenvolumens)
pg	Pikogramm
P-LCR	platelet large cell ratio (Anteil großer Thrombozyten)
PLT Clumps, abs.	Thrombozytenagglutinate
PLT Clumps, rel.	prozentualer Anteil der Thrombozytenagglutinate

PLT	platelets (Thrombozyten)
PLT-I	platelet count (Thrombozytenbestimmung des XT-2000iV mittels Impedanzmessung)
PLT-O	platelet count (optische Thrombozytenmessung des XT-2000iV)
PMDW	platelet mass distribution width (Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse)
pre-mRNA	precursor-messenger-ribonucleic acid
QBC	quantitative buffy coat
RBC Fragments	Erythrozytenfragmente
RBC Ghosts	Erythrozytenzellmembranen
RBC	red blood cells (Erythrozyten)
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite
RDWr	red cell distribution width – reticulocytes (Retikulozytenverteilungsbreite)
RET/RETIC	reticulocytes (Retikulozyten)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	ribonuclease (Ribonuklease)
ROC-Kurve	Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (Grenzwertoptimierungskurve)
r-PLT	reticulated platelets (retikulierte Thrombozyten)
RPR	residual platelet reactivity
r_s	spearman's rank correlation coefficient (Korrelationskoeffizient nach Spearman)
SCF	stem cell factor (Stammzellfaktor)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SFL	side fluorescence (Seitenfluoreszenzlicht)

SLS	Sodiumlaurylsulfat
TRAP	thrombin receptor activating peptide
TTP	thrombotisch-thrombozytopenische Purpurea
WBC	white blood cells (Leukozyten)
XT	Sysmex XT-2000iV

10 Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz für die Überlassung dieses spannenden Themas, die hervorragende Betreuung und die begeisternden Diskussionen. Danke für die Unterstützung, die meine Arbeit in dieser Form erst möglich machte.

PD Dr. Natali Bauer für ihre unersetzliche Hilfe bei fachlichen Fragen und besonders bei der statistischen Auswertung.

Herzlichen Dank an Dr. Melanie Ginder für die fachkundige Hilfestellung und ihre besonders engagierte Unterstützung bei meiner Arbeit. Der Firma Sysmex Europe GmbH danke ich für das Zurverfügungstellen der Gerätesoftware.

Dipl.-Ing. Gottfried Prechtel für die großartige Einführung in die Software und die vielen hilfreichen Anregungen.

Vielen Dank an Dr. Iris Kampfmann für das Zurverfügungstellen ihrer Daten.

Danke an meine Freunde, dass Ihr mir zur Seite steht und für die schöne Zeit.

Danke an Andreas für Deine liebevolle Unterstützung, Rückhalt, Verständnis und auch für die Hilfe bei Fragen rund um die Technik.

Ganz besonders bedanke ich mich bei der besten Mutter, die glücklicherweise meine ist, für die grandiose Unterstützung in schönen wie in schweren Zeiten und natürlich auch bei meiner Doktorarbeit.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Erlangen, den 26.10.2014

Dana Oellers

Anhang

Inhaltsverzeichnis

Methodenvergleich	2
Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse, Passing-Bablok-Regression	2
Relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates	2
Relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates zu den r-PLT-Werten des ADVIA 120/2120	42
 Der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern	 74
Spearman-Korrelation zwischen r-PLT und Thrombozytenparametern, XT-2000iV	74
Spearman-Korrelation zwischen r-PLT und Thrombozytenparametern, ADVIA 120/2120	90
 Referenzintervalle – Histogramme der Verteilung	 103
Alle Hunde	103
Retikulierte Thrombozyten	103
Thrombozytenindizes ADVIA 120/2120	108
Thrombozytenindizes XT-2000iV	115
Beagle	119
Retikulierte Thrombozyten	119
Thrombozytenindizes ADVIA 120/2120	124
Thrombozytenindizes XT-2000iV	131
Hunde verschiedener Rassen	135
Retikulierte Thrombozyten	135
Thrombozytenindizes ADVIA 120/2120	140
Thrombozytenindizes XT-2000iV	147

Methodenvergleich

Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates

- Vergleich des r-PLT-Gates **nach Gelain et al.** des XT-2000iV mit dem r-PLT-**Gate A** des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

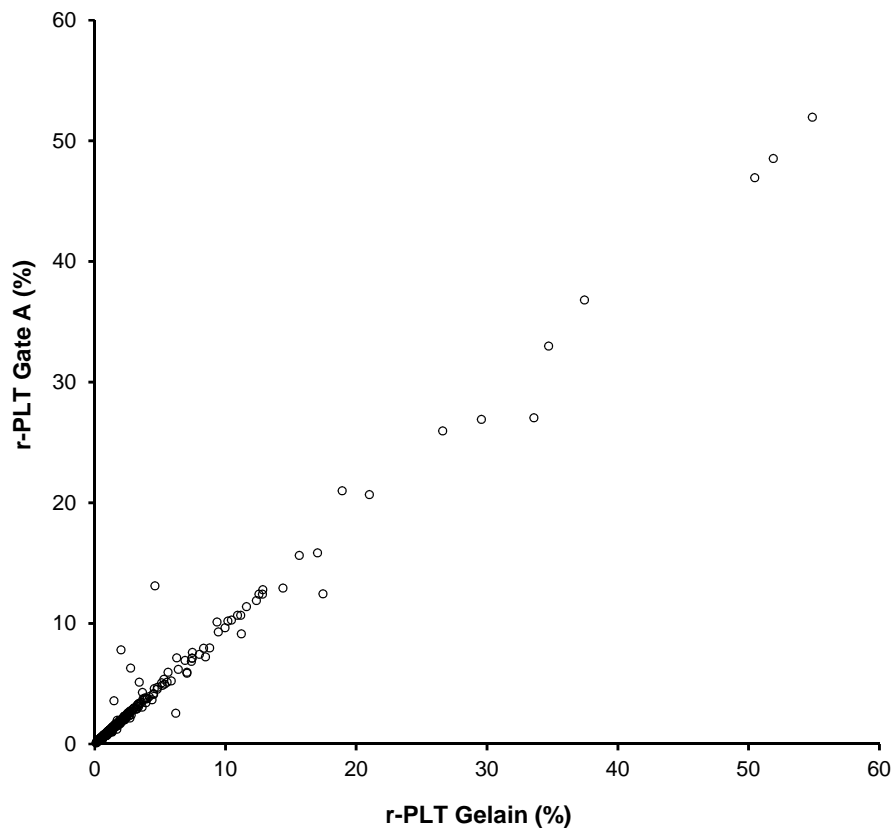
Date | 11 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,99
95% CI | 0,99 to 0,99 (normal approximation)

t statistic | 154,37
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,62

Bias | -0,130
95% CI | -0,220 to -0,040
SE | 0,0457

t statistic | -2,85
DF | 361
p | 0,0046

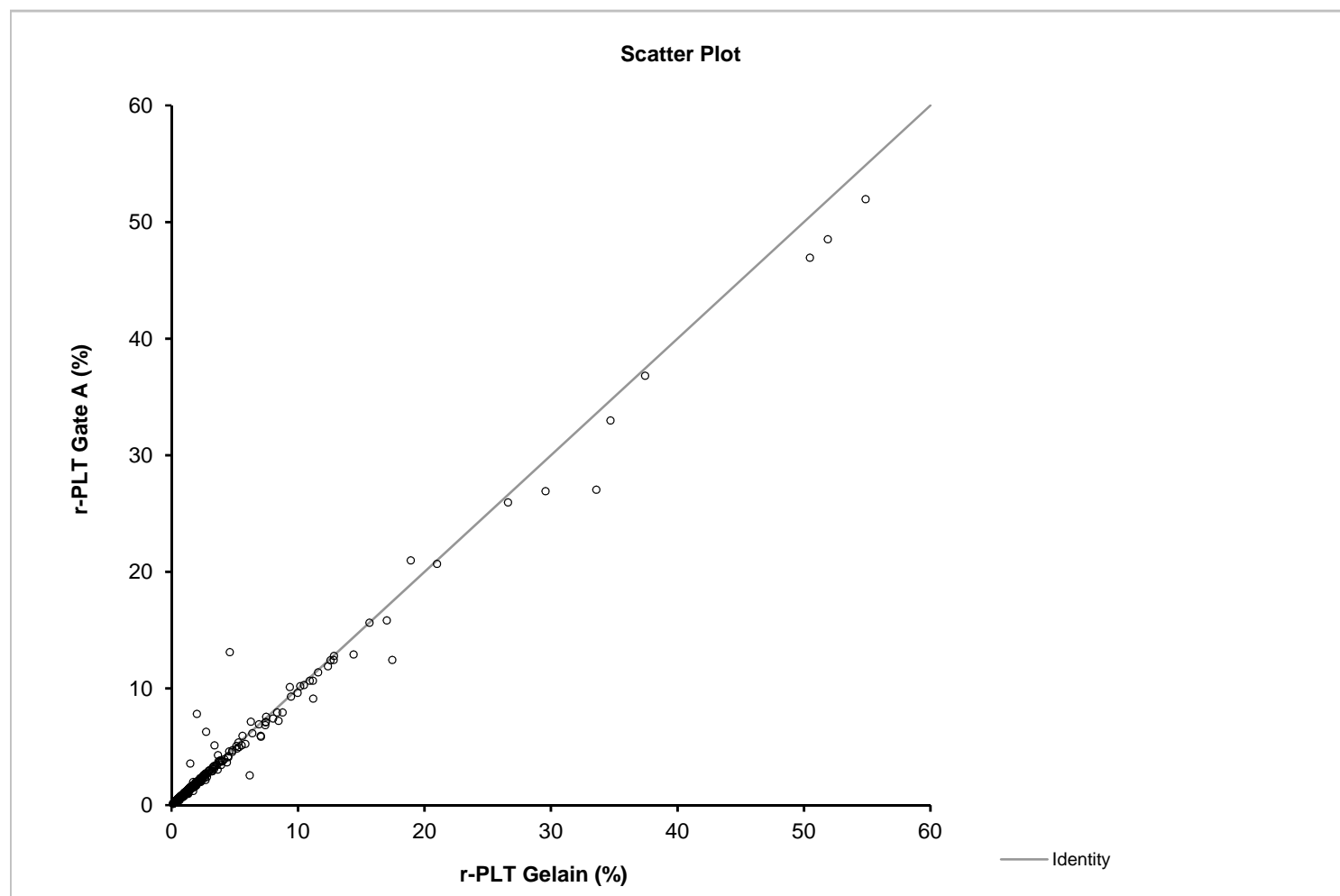
SD of differences | 0,870 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-1,835	-1,989 to -1,681
Upper	1,574	1,421 to 1,728

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

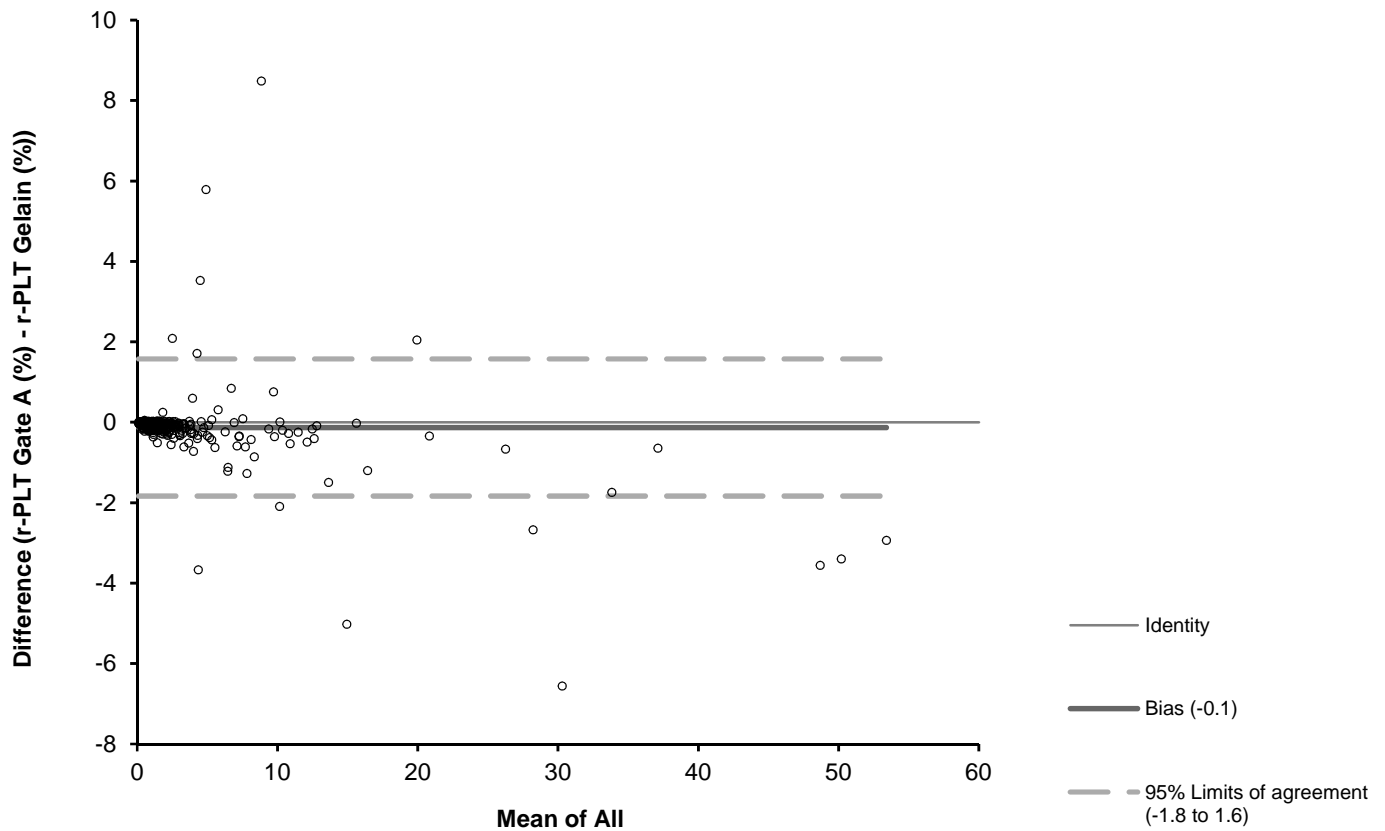


Test | **Agreement - Altman Bland test**

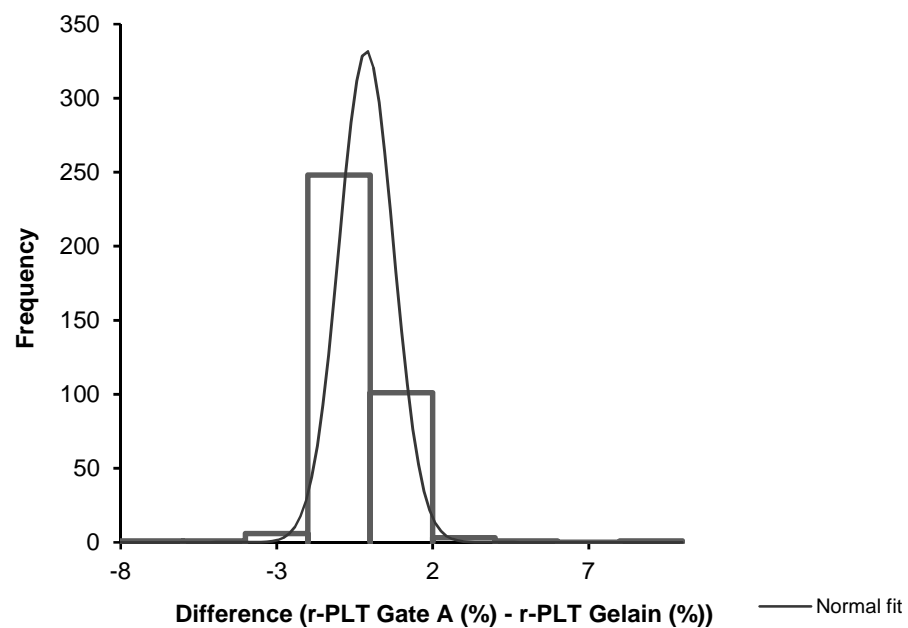
Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Difference Plot



Histogram of Differences



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Range | 0,110 to 54,890

Replicates

r-PLT Gelain (%)	1
r-PLT Gate A (%)	1

Bias

95% CI

Constant	-0,01	-0,02 to 0,00
Proportional	0,97	0,95 to 0,97

H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

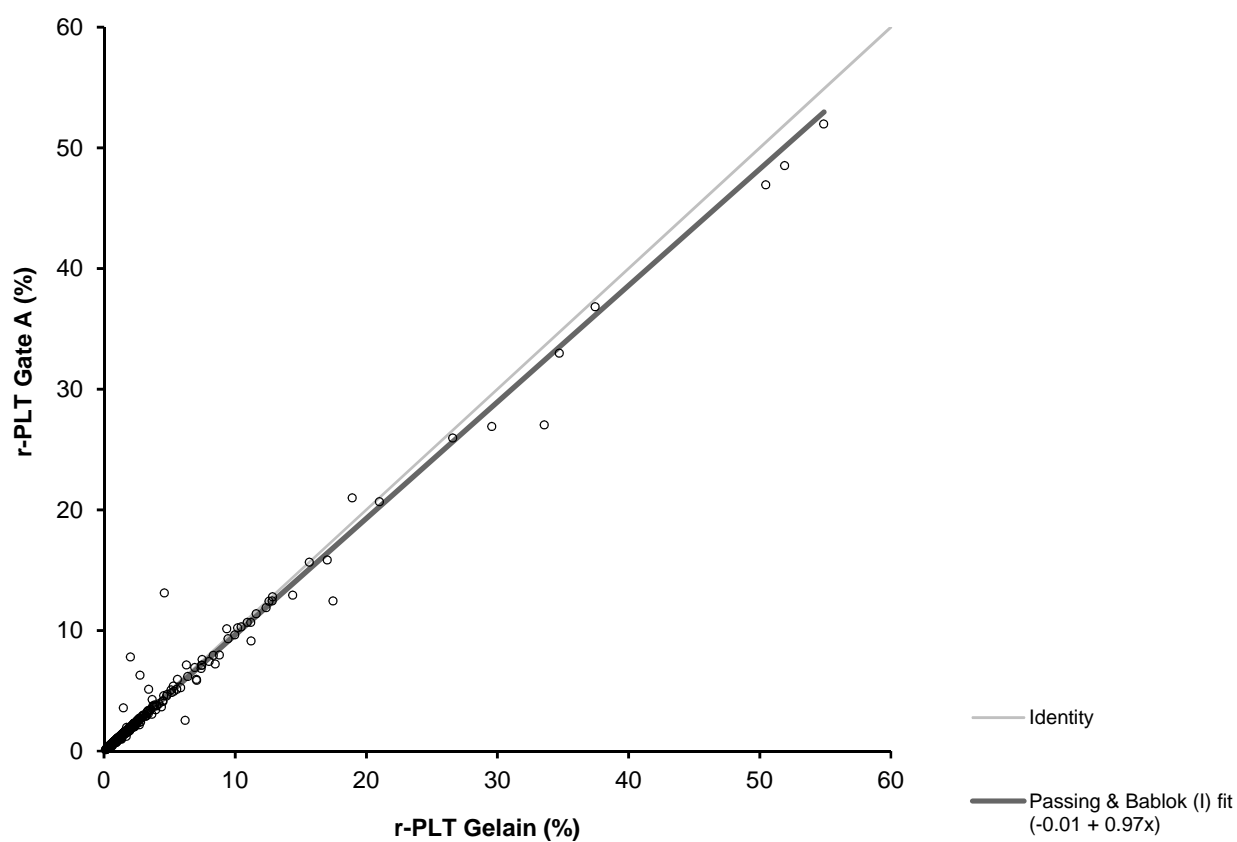
H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

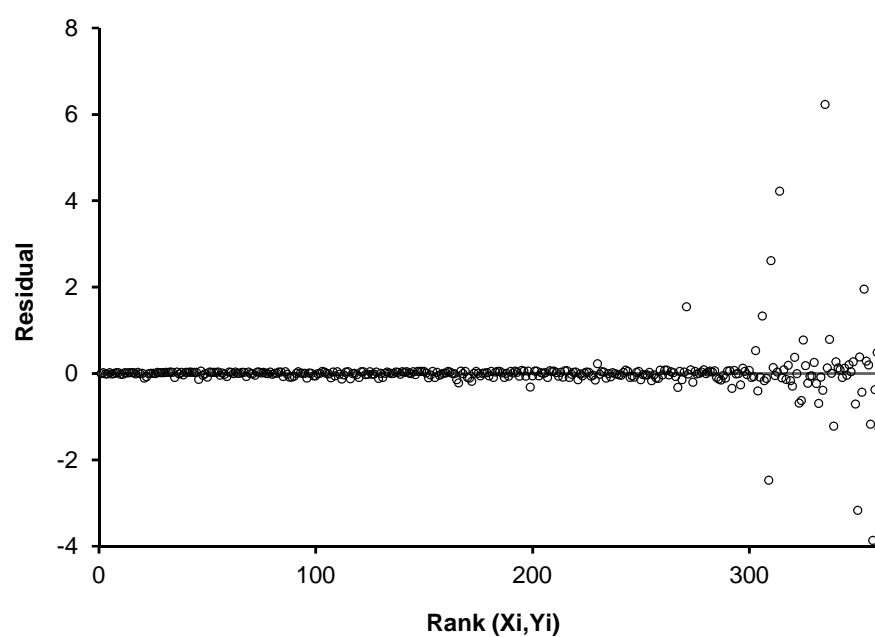
Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Scatter Plot with Passing & Bablok Fit



Residual Plot



Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates

- Vergleich des r-PLT-Gates **nach Gelain et al.** des XT-2000iV mit dem r-PLT-Gate **nach Oellers et al.** des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

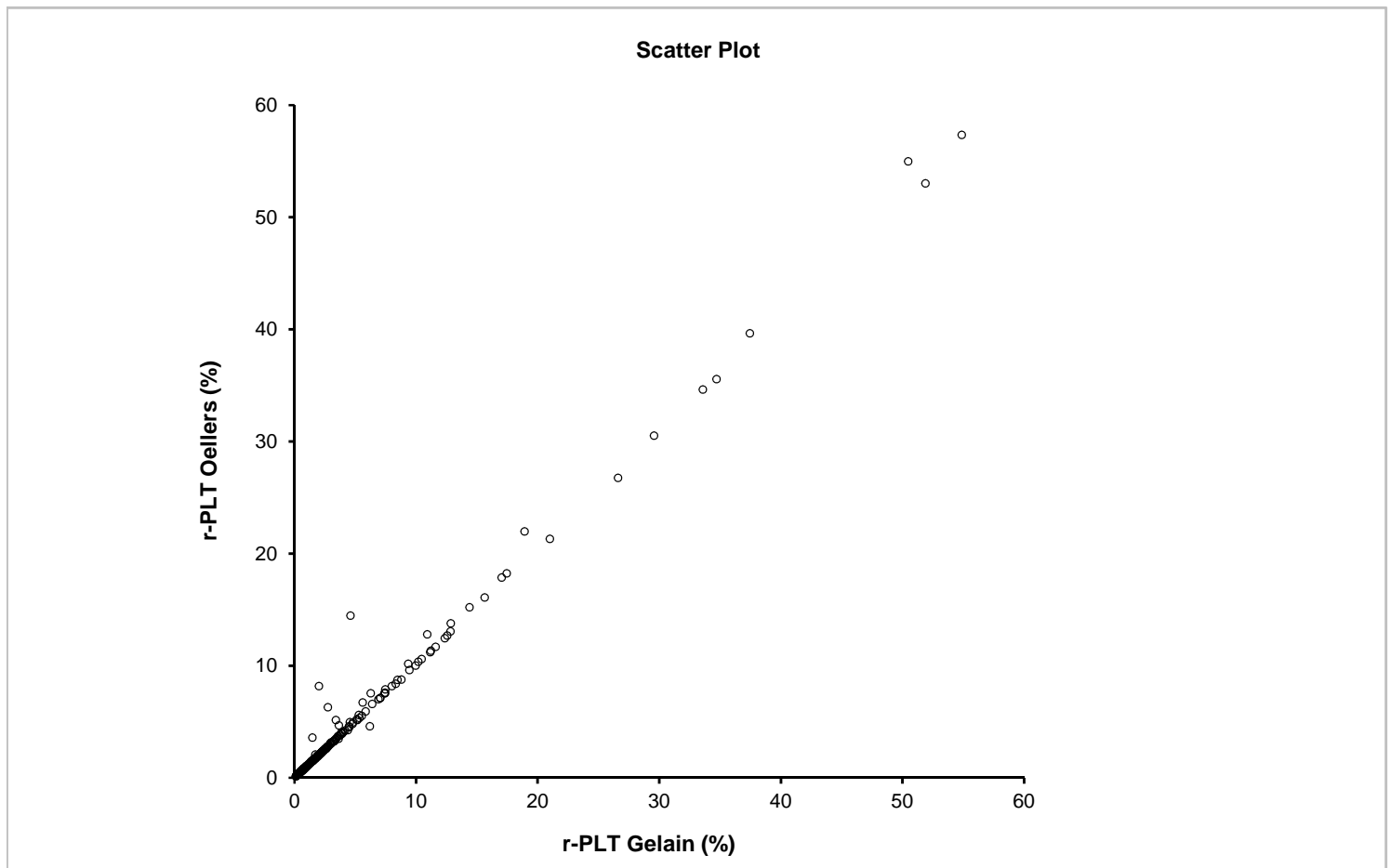
Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT . rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

rs statistic | 1,00
95% CI | 1,00 to 1,00 (normal approximation)

t statistic | 254,11
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)



Test | Agreement - Altman Bland test

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,76

Bias | 0,150
95% CI | 0,072 to 0,227
SE | 0,0396

t statistic | 3,78
DF | 361
p | 0,0002

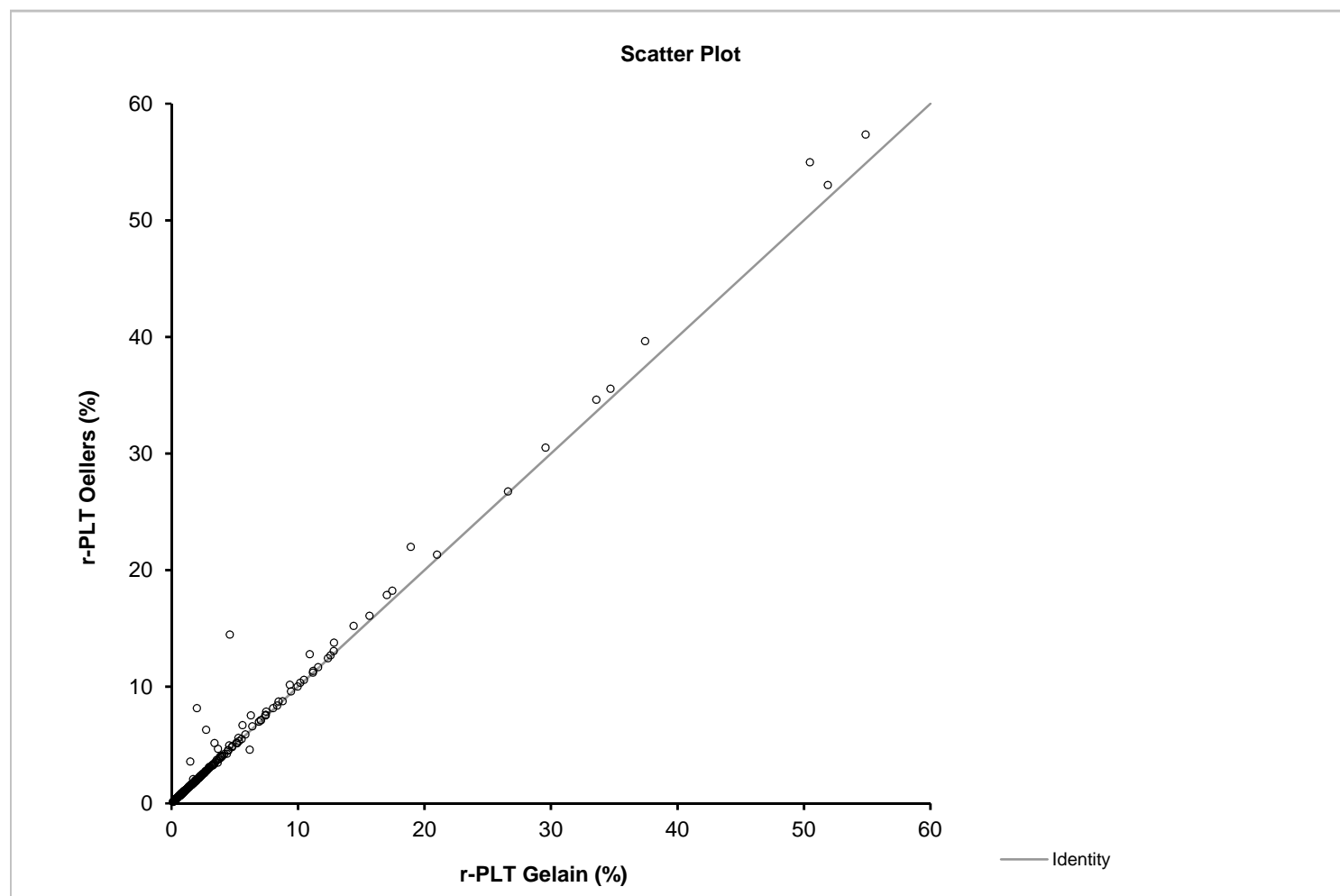
SD of differences | 0,752 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-1,325	-1,458 to -1,192
Upper	1,624	1,491 to 1,757

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelatin (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

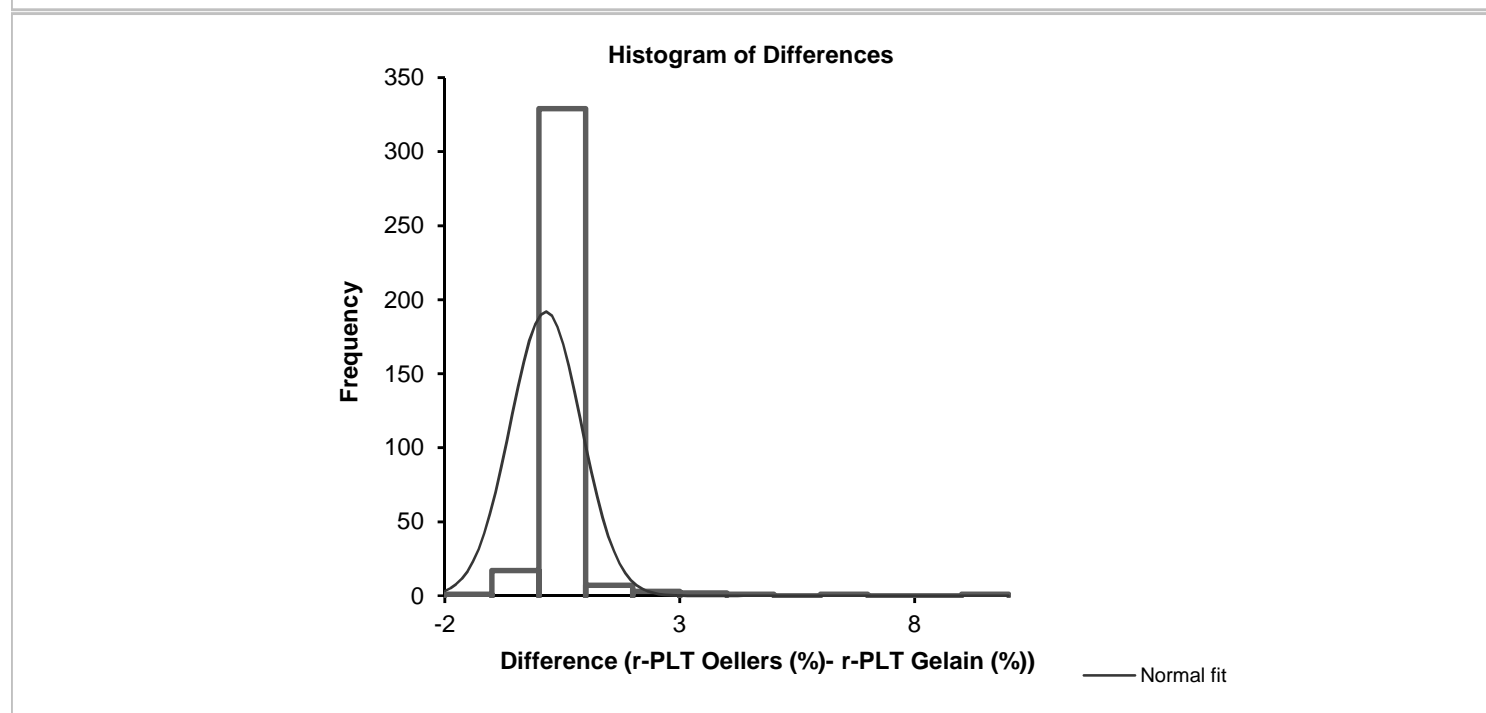
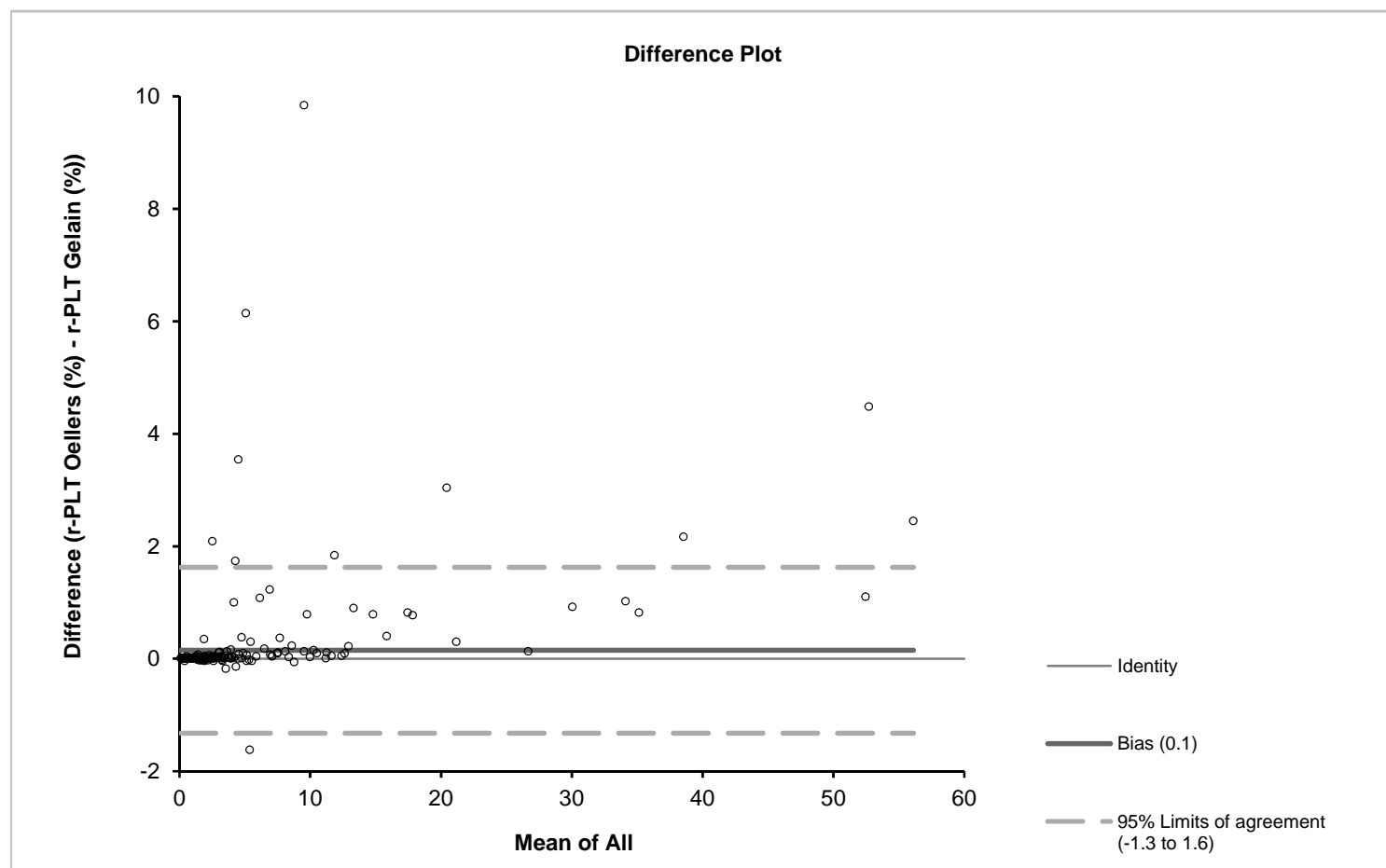
Date | 11 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Range | 0,110 to 54,890

Replicates

r-PLT Gelain (%)	1
r-PLT Oellers (%)	1

Bias

95% CI

Constant	0,00	0,00 to 0,00
Proportional	1,01	1,01 to 1,01

H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

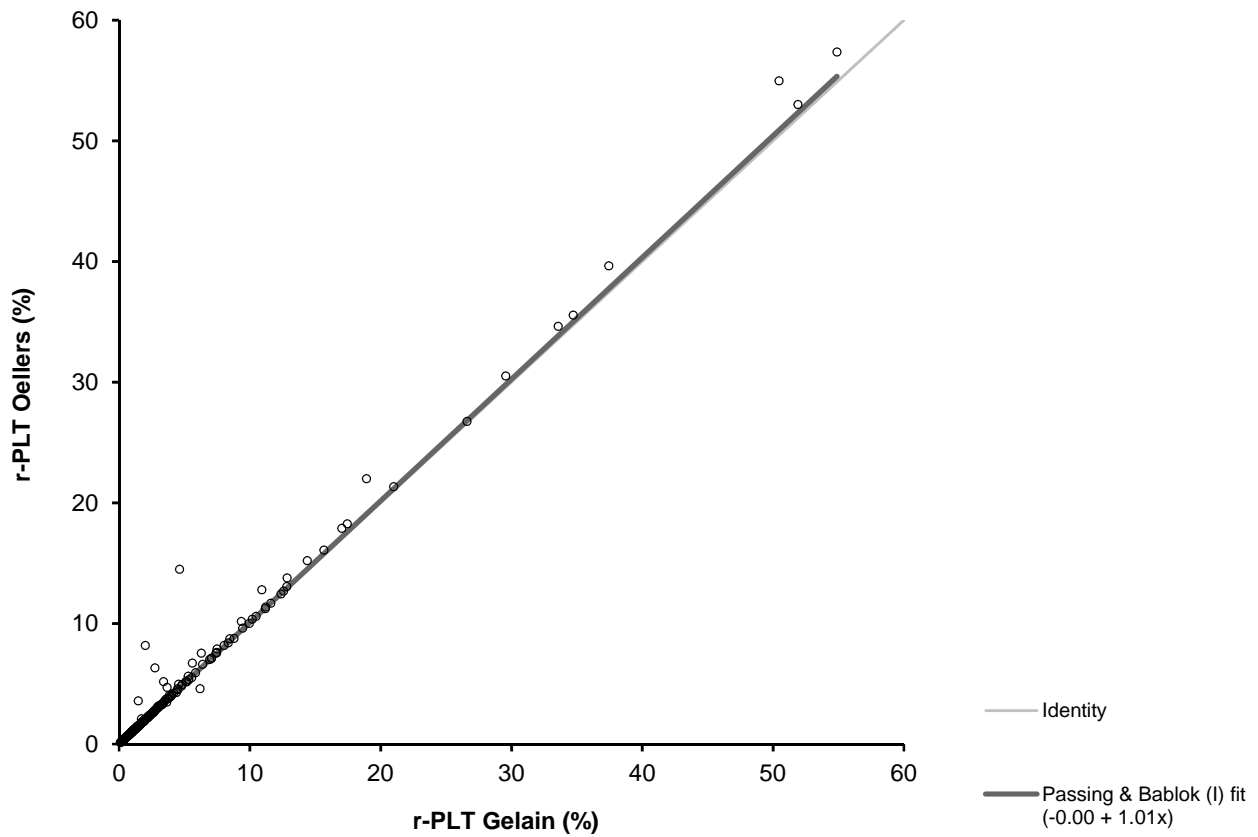
H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

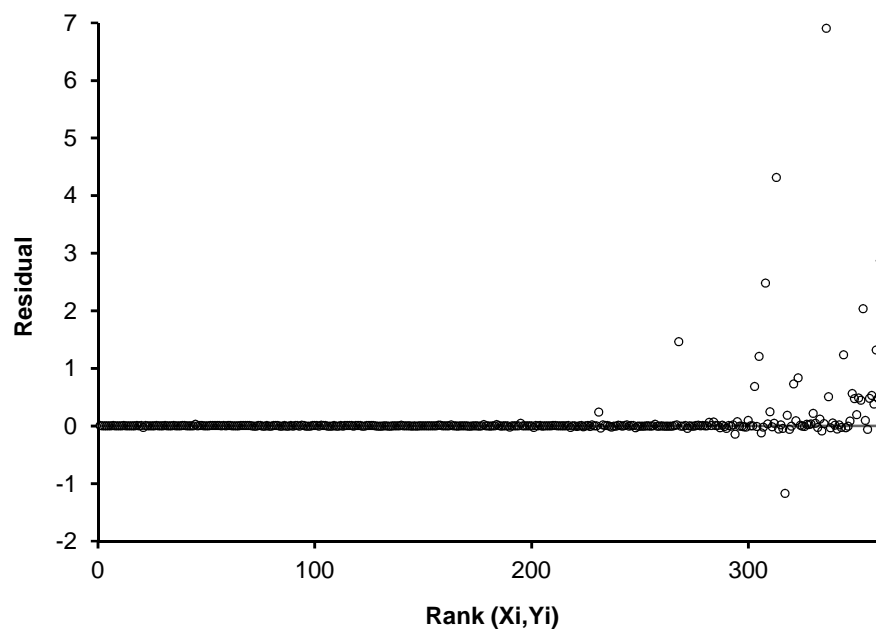
Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Scatter Plot with Passing & Bablok Fit



Residual Plot



Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates

- Vergleich des r-PLT-Gates **nach Pankraz et al.** des XT-2000iV mit dem r-PLT-**Gate A** des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

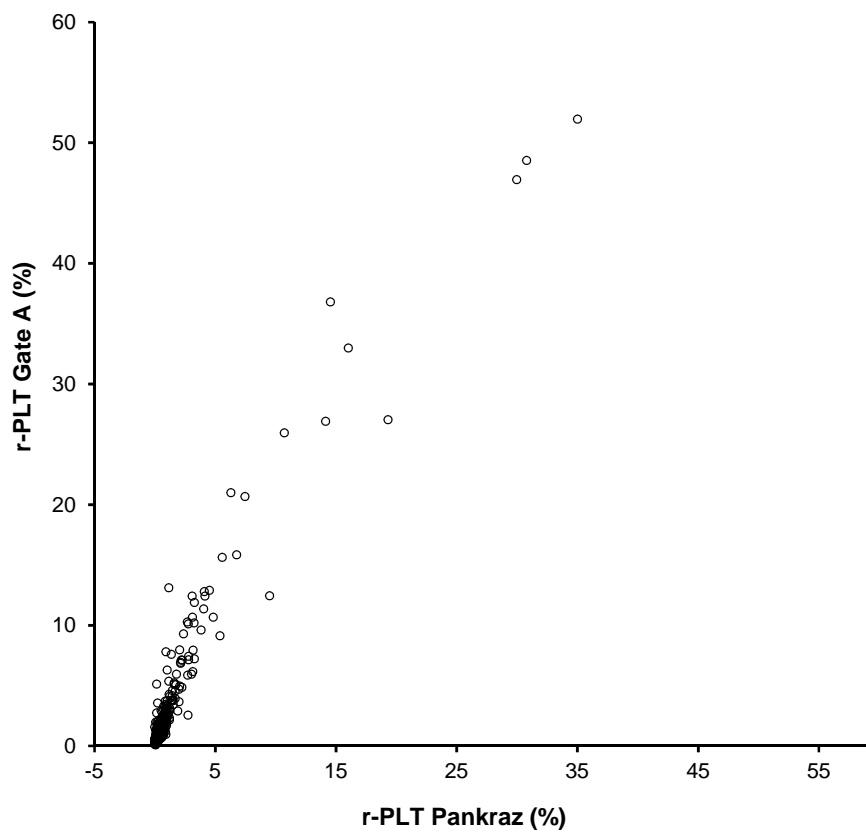
Date | 11 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,86
95% CI | 0,83 to 0,89 (normal approximation)

t statistic | 32,33
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,91

Bias | 1,861
95% CI | 1,553 to 2,170
SE | 0,1569

t statistic | 11,86
DF | 361
p | <0.0001

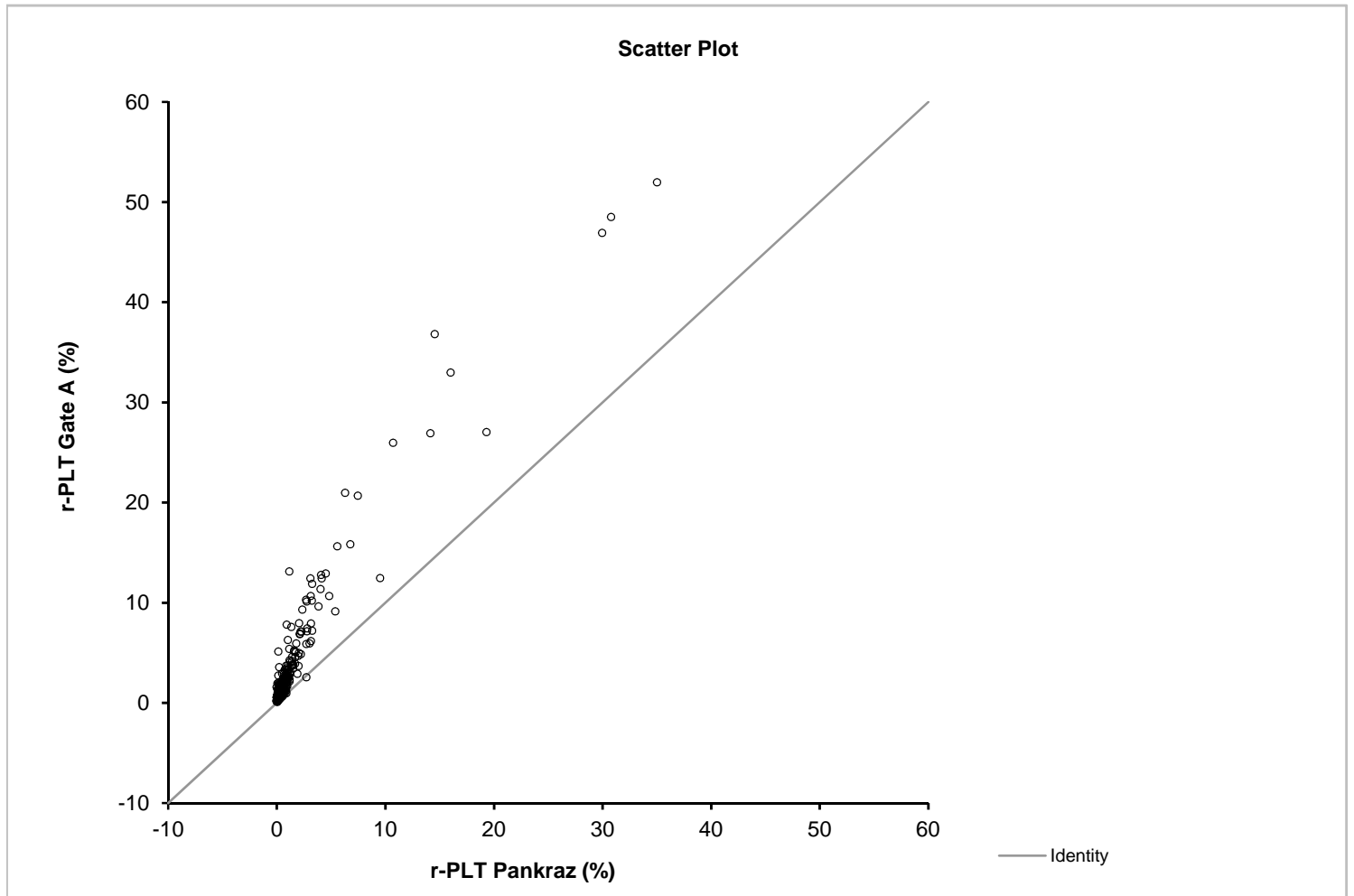
SD of differences | 2,986 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-3,991	-4,519 to -3,463
Upper	7,714	7,186 to 8,242

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

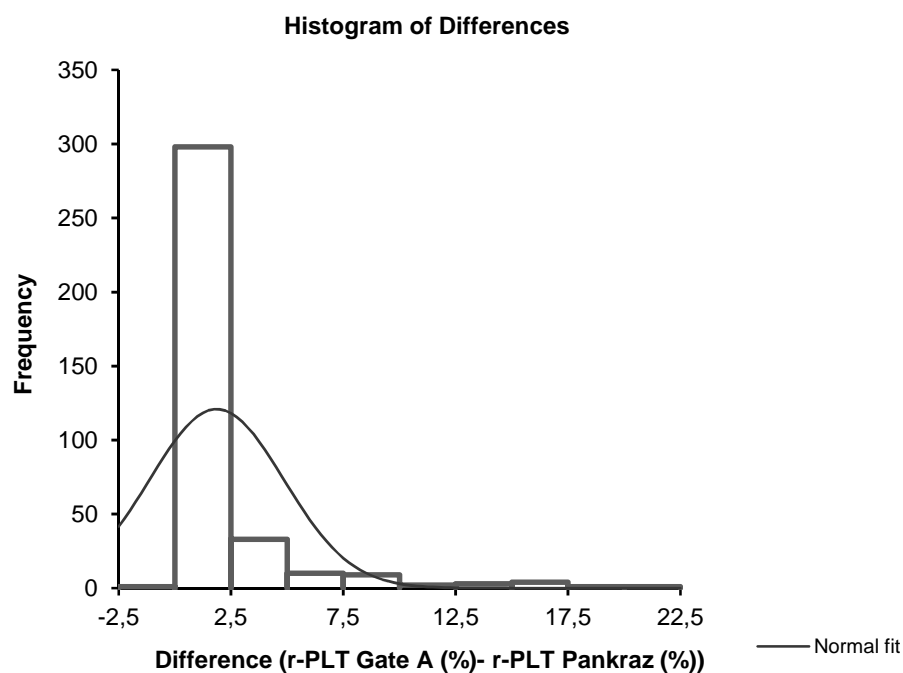
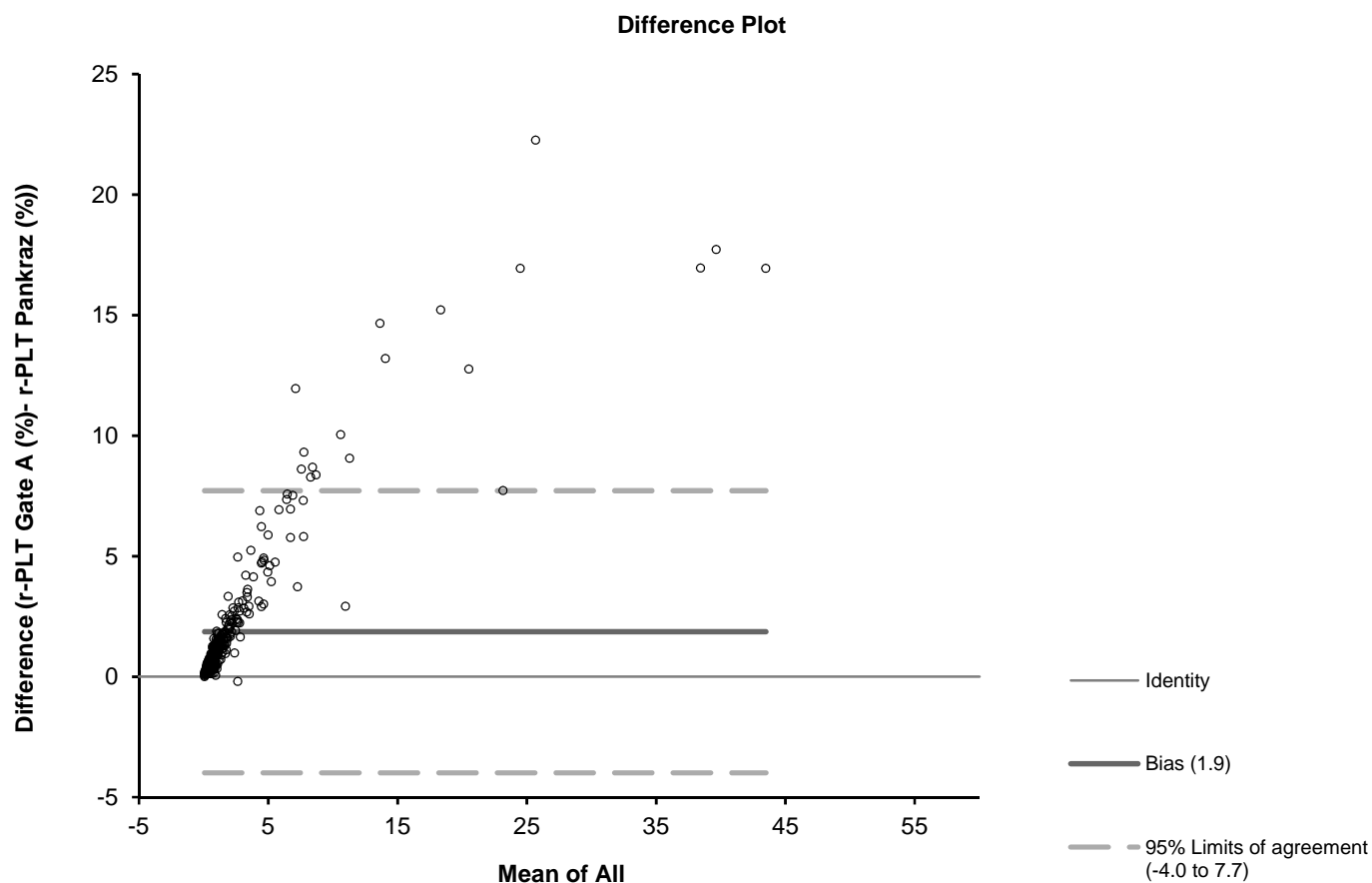
Date | 11 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Range | 0,000 to 35,020

Replicates

r-PLT Pankraz (%)	1
r-PLT Gate A (%)	1

Bias

95% CI

Constant	0,13	0,07 to 0,20
Proportional	2,81	2,67 to 2,98

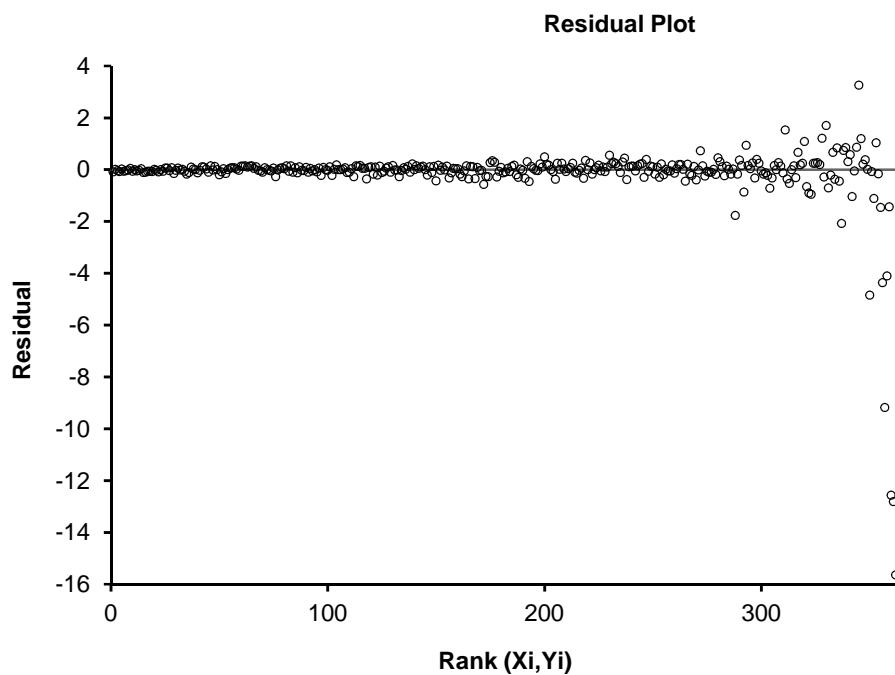
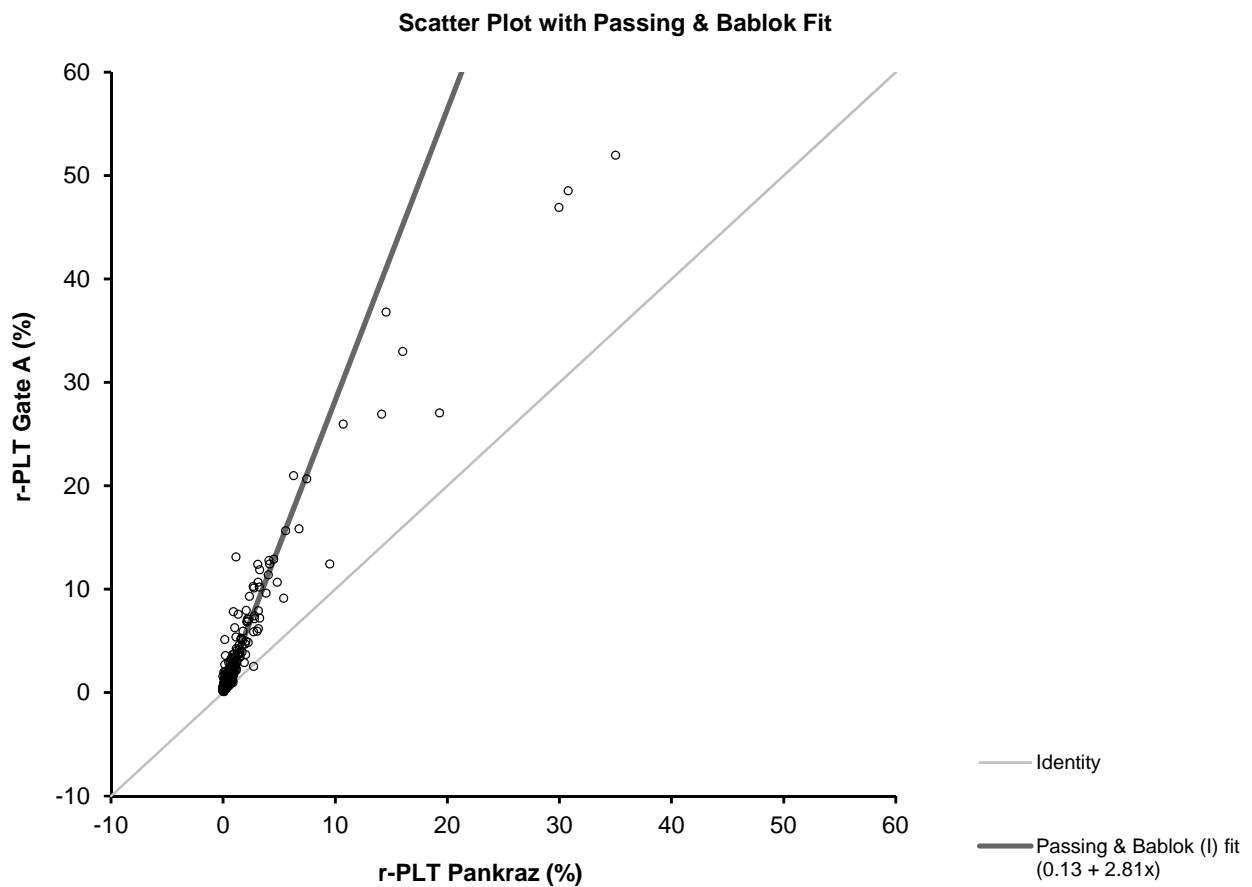
H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gate A (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013



Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates

- Vergleich des r-PLT-Gates **nach Pankraz et al.** des XT-2000iV mit dem r-PLT-Gate **nach Gelain et al.** des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

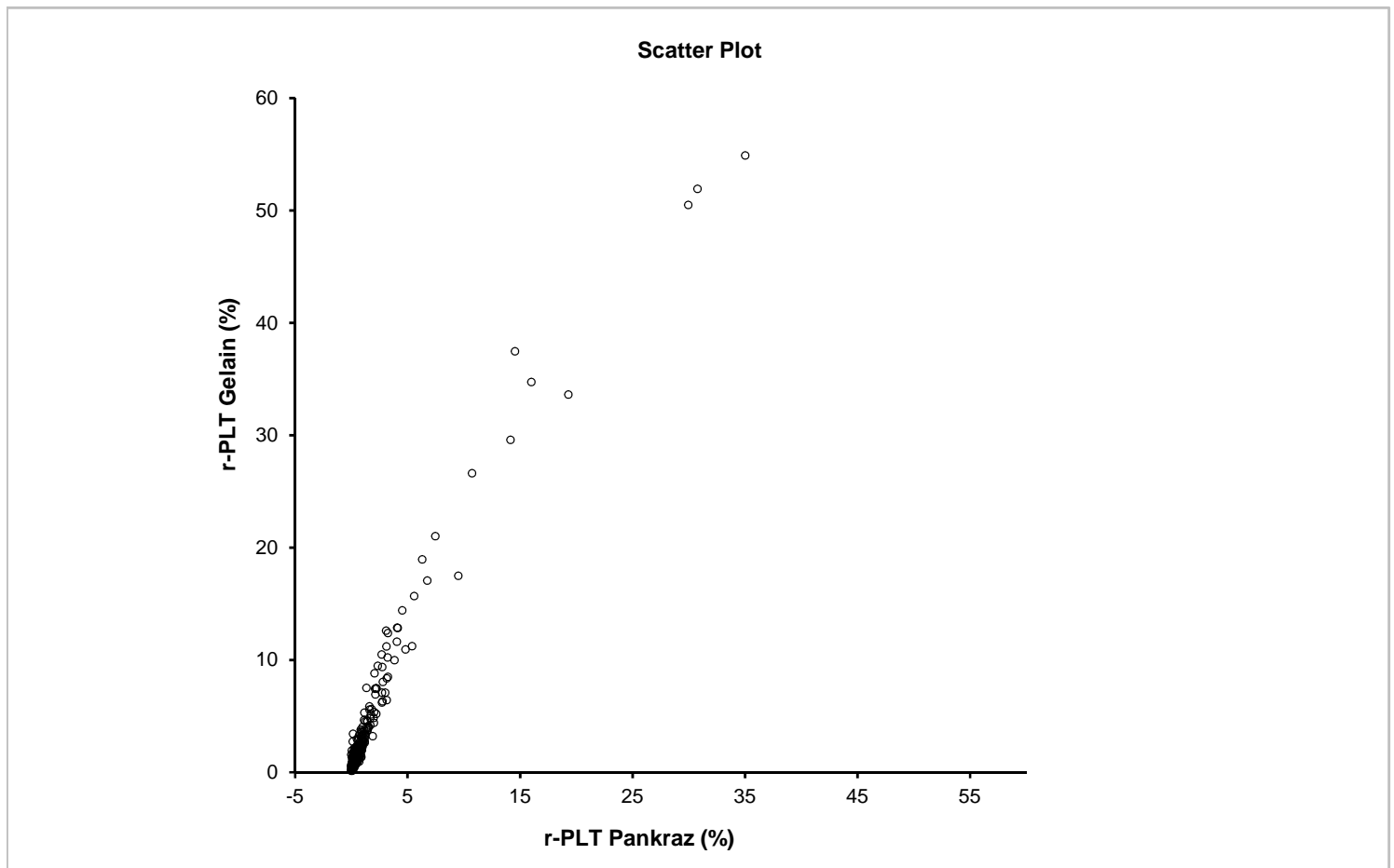
Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gelain (%) XT. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,89
95% CI | 0,86 to 0,91 (normal approximation)

t statistic | 36,61
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gelain (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,93

Bias | 1,992
95% CI | 1,658 to 2,326
SE | 0,1699

t statistic | 11,73
DF | 361
p | <0.0001

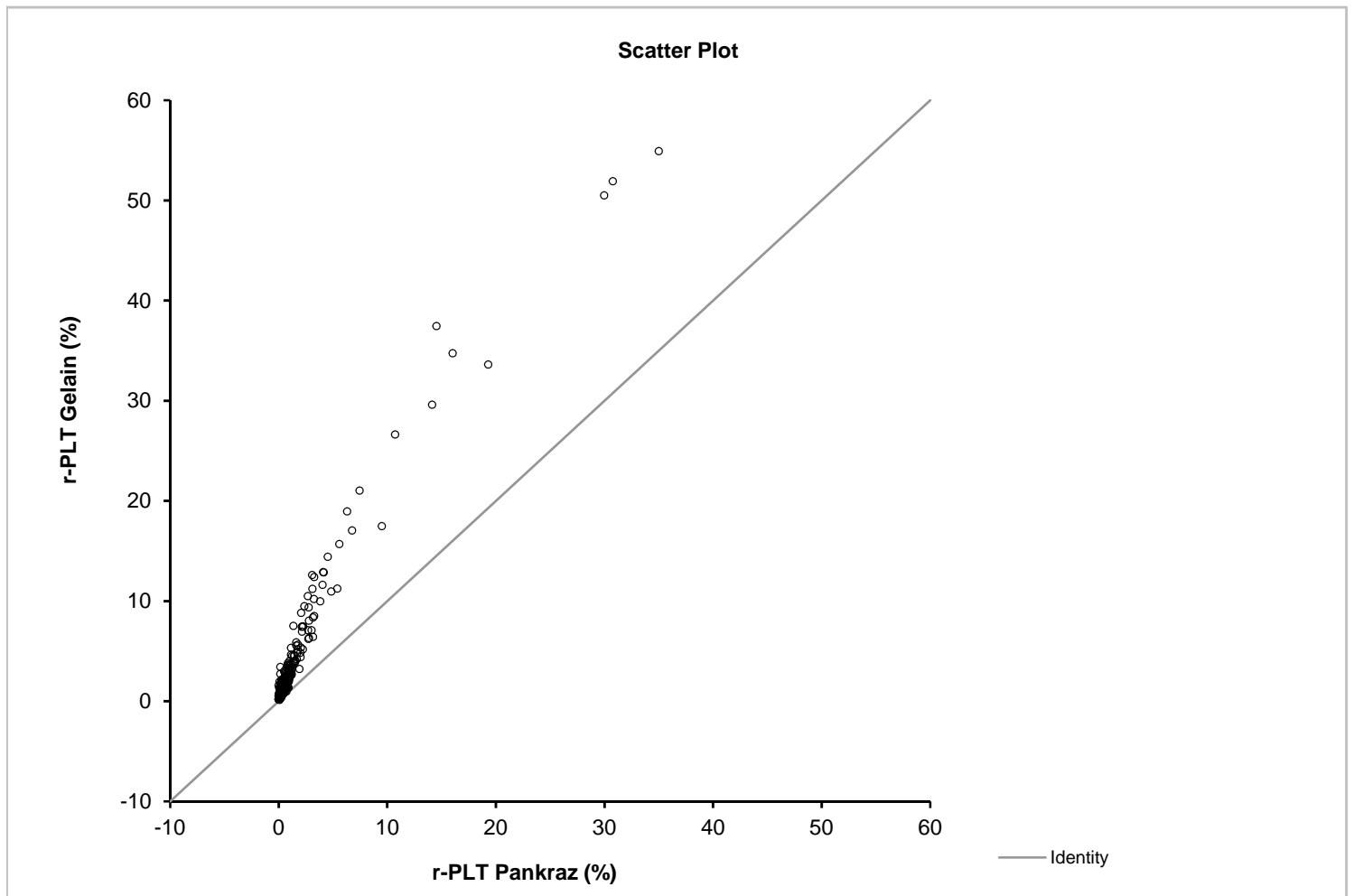
SD of differences | 3,232 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-4,343	-4,914 to -3,771
Upper	8,326	7,755 to 8,898

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gelain (%) XT
Hochschulrechenzentrum

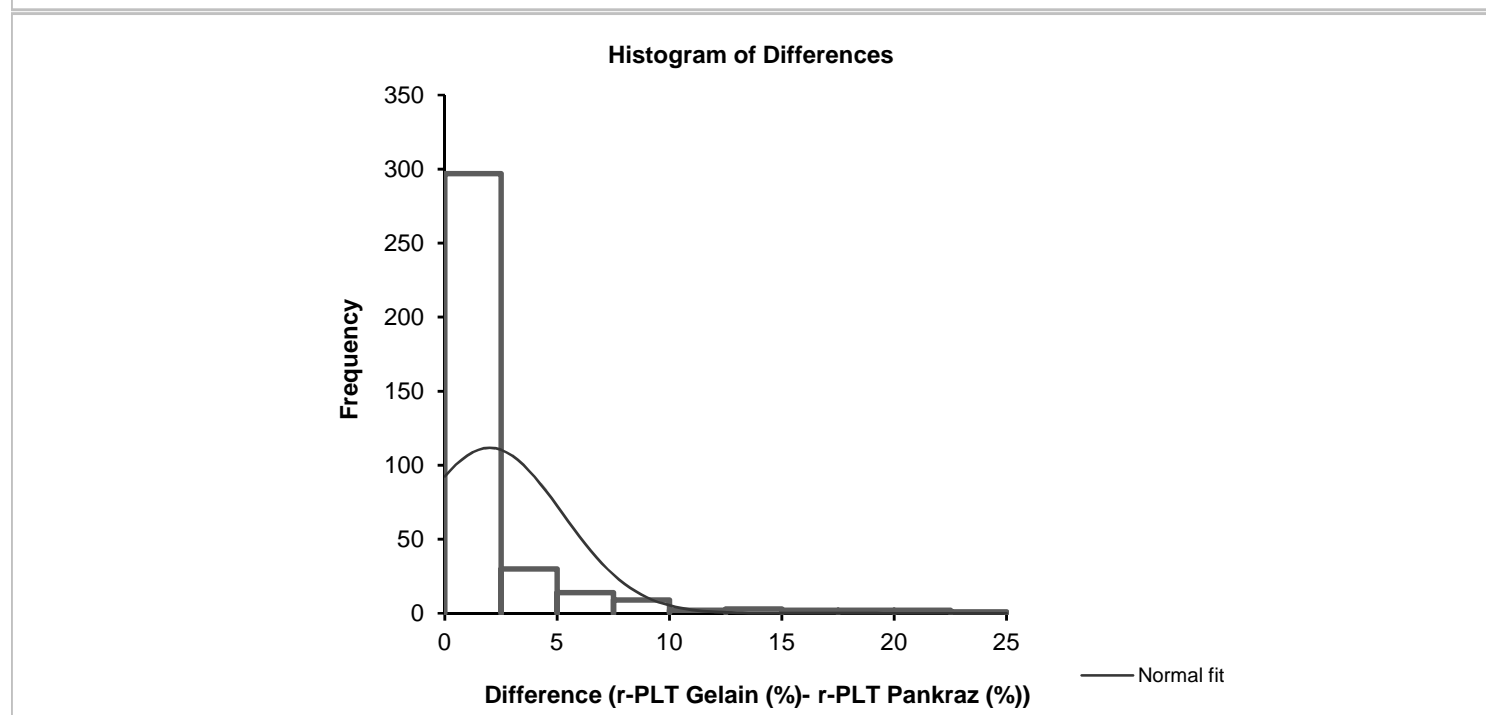
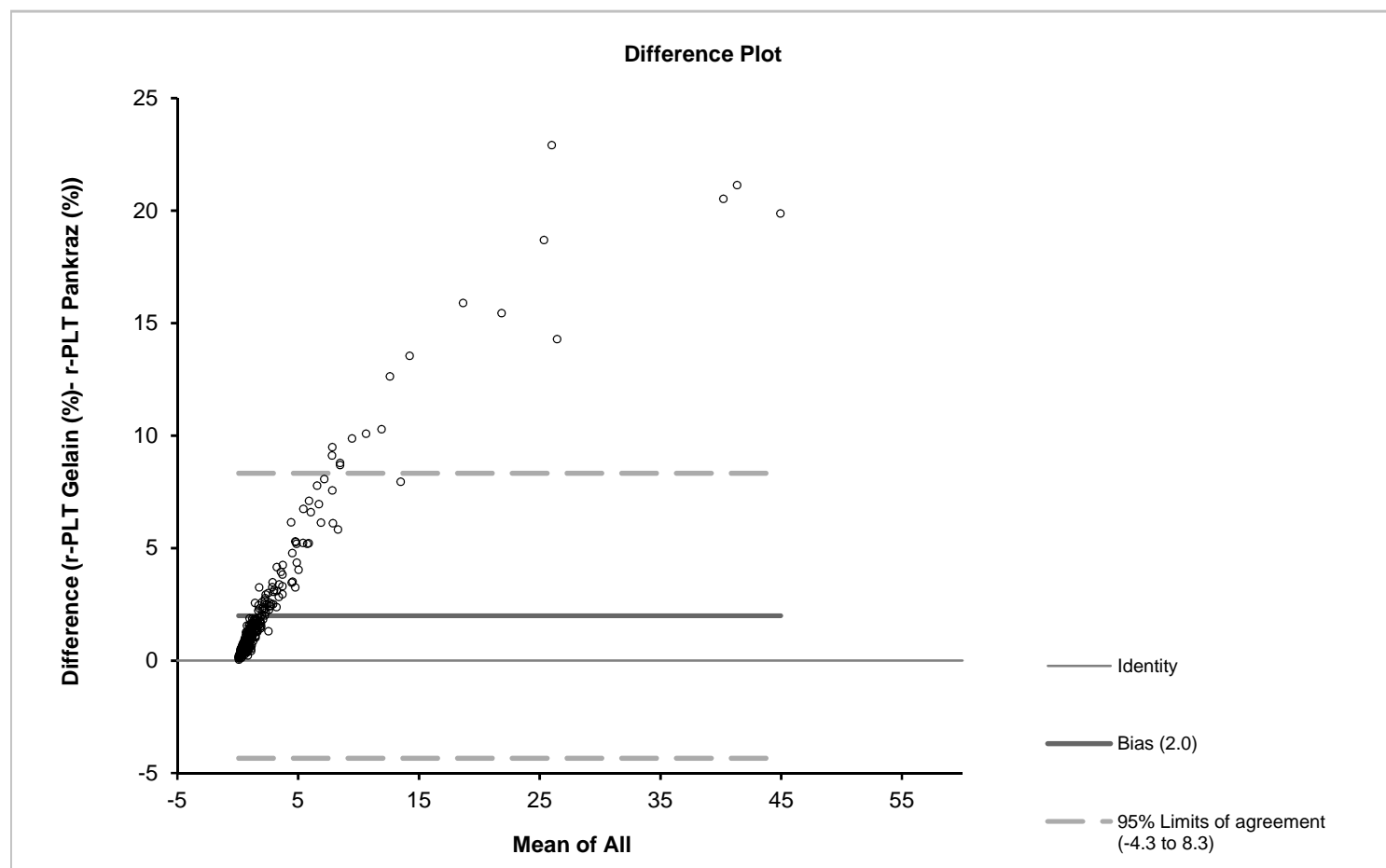
Date | 11 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gelain (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gelain (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gelain (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Range | 0,000 to 35,020

Replicates

r-PLT Pankraz (%)	1
r-PLT Gelain (%)	1

Bias

95% CI

Constant	0,18	0,12 to 0,23
Proportional	2,83	2,70 to 2,99

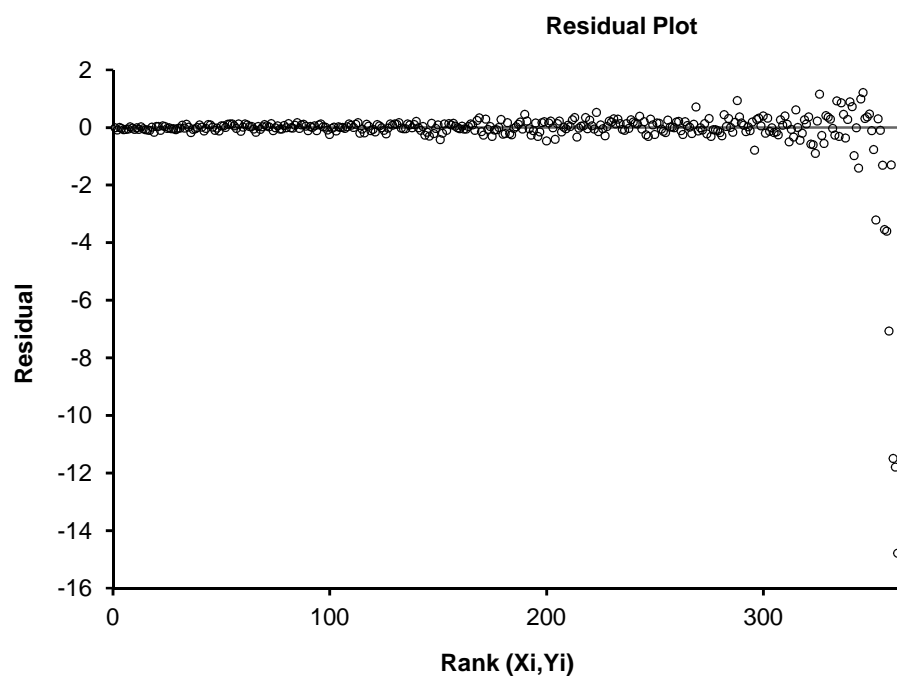
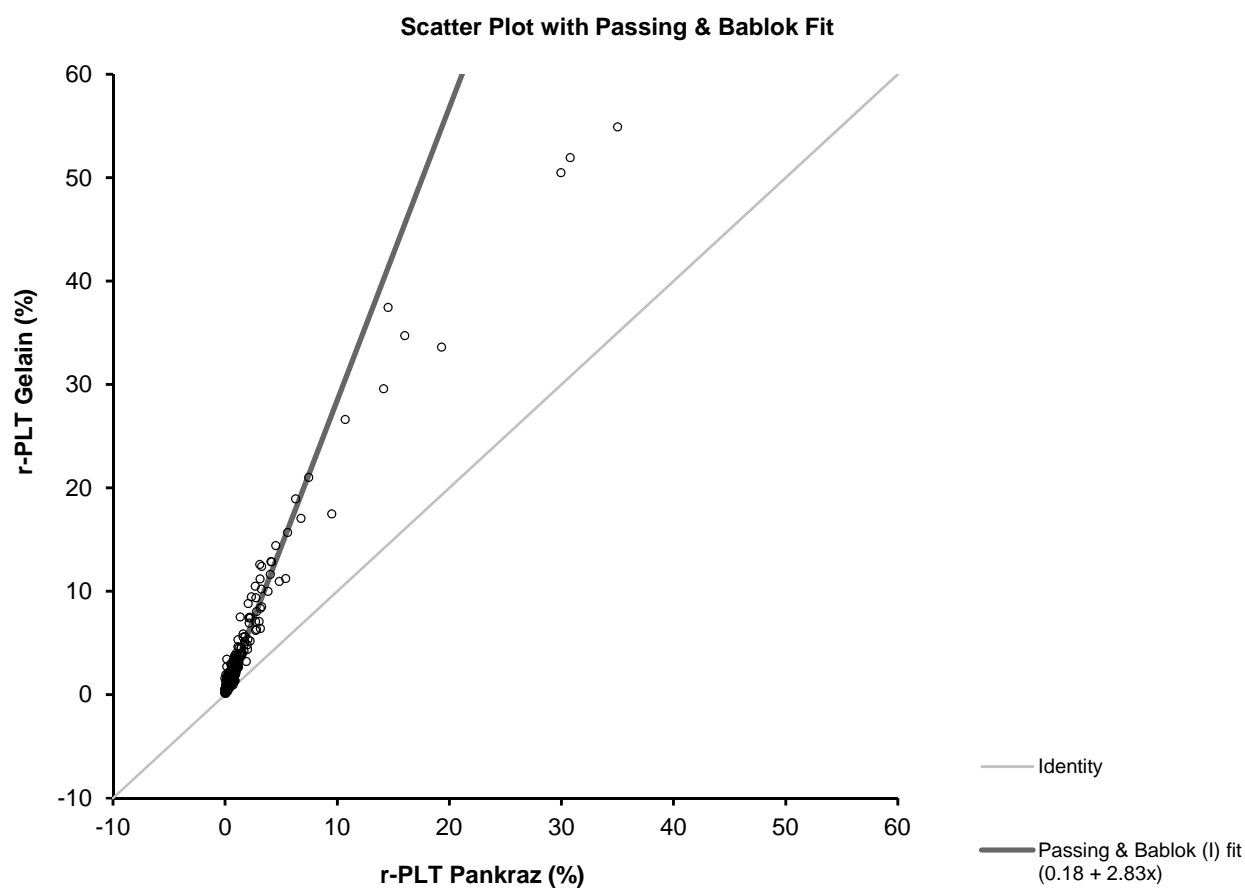
H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Gelain (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013



Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates

- Vergleich des r-PLT-Gates **nach Pankraz et al.** des XT-2000iV mit dem r-PLT-Gate **nach Oellers et al.** des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

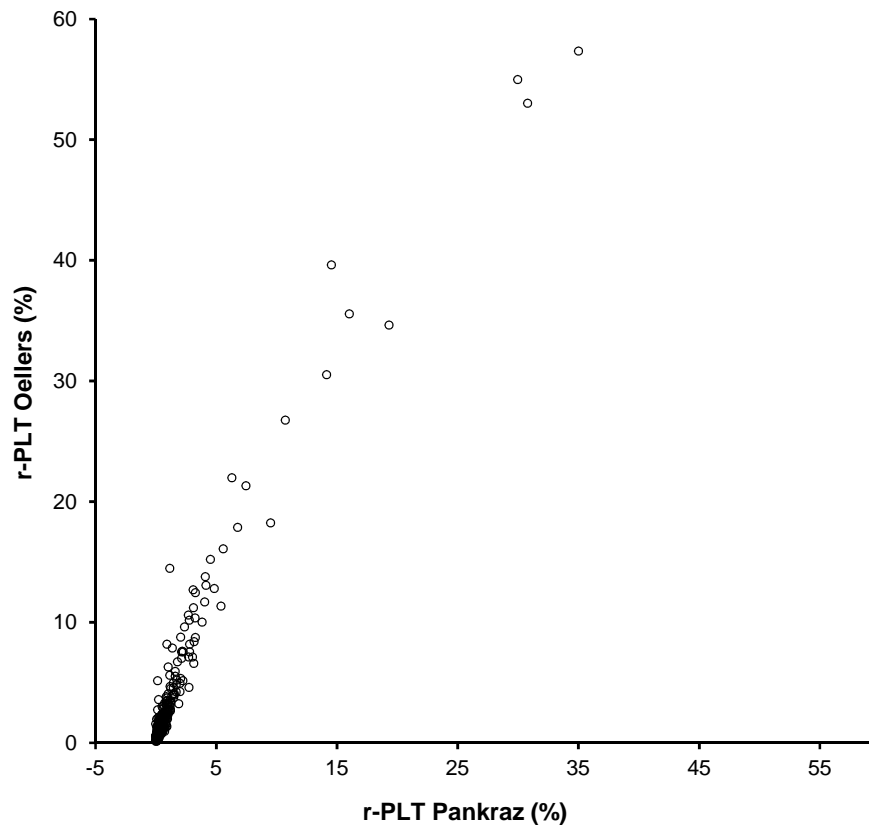
Date | 11 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,88
95% CI | 0,86 to 0,90 (normal approximation)

t statistic | 35,76
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,94

Bias | 2,141
95% CI | 1,771 to 2,511
SE | 0,1882

t statistic | 11,38
DF | 361
p | <0.0001

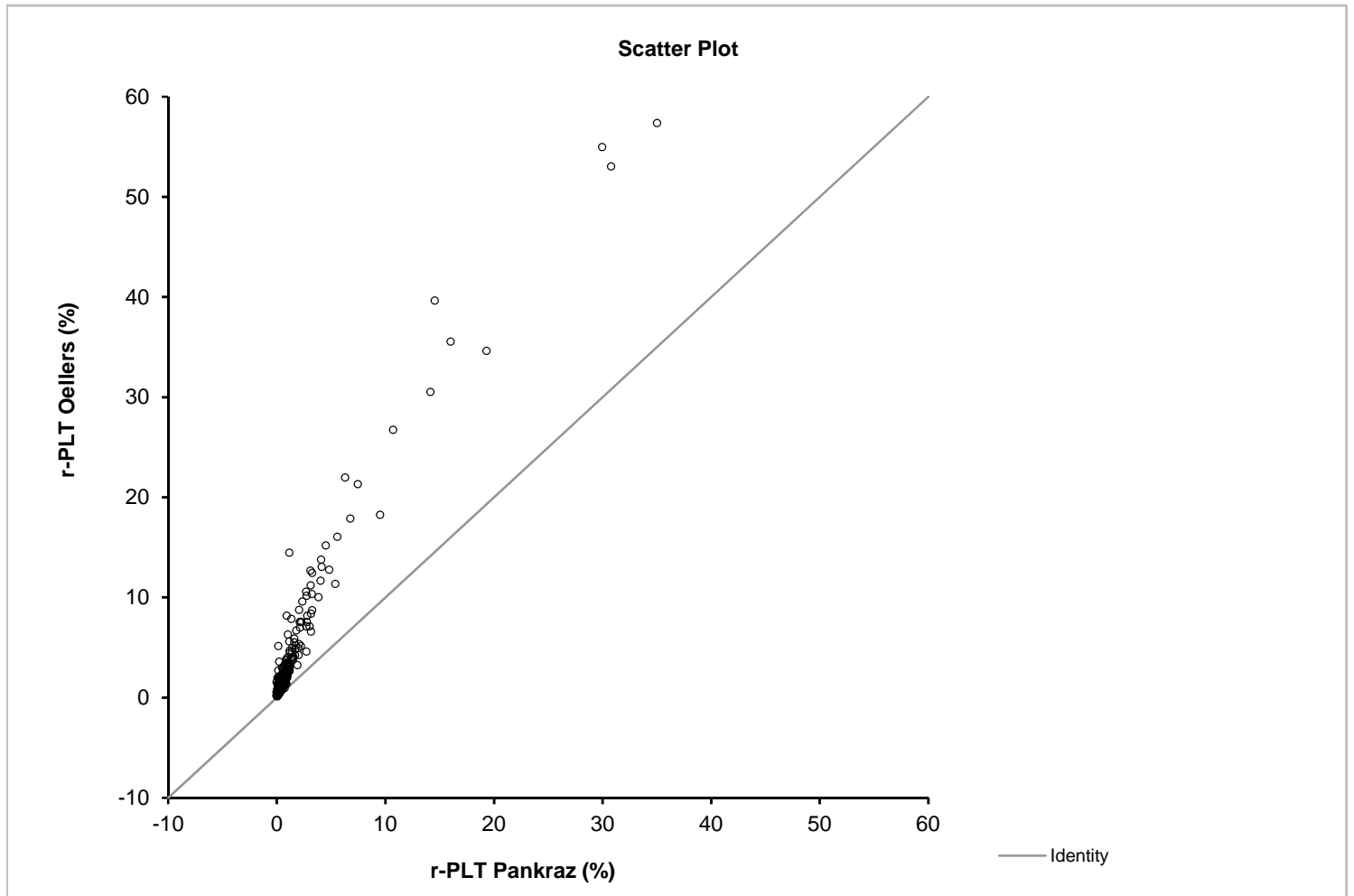
SD of differences | 3,581 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-4,877	-5,510 to -4,244
Upper	9,159	8,526 to 9,792

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

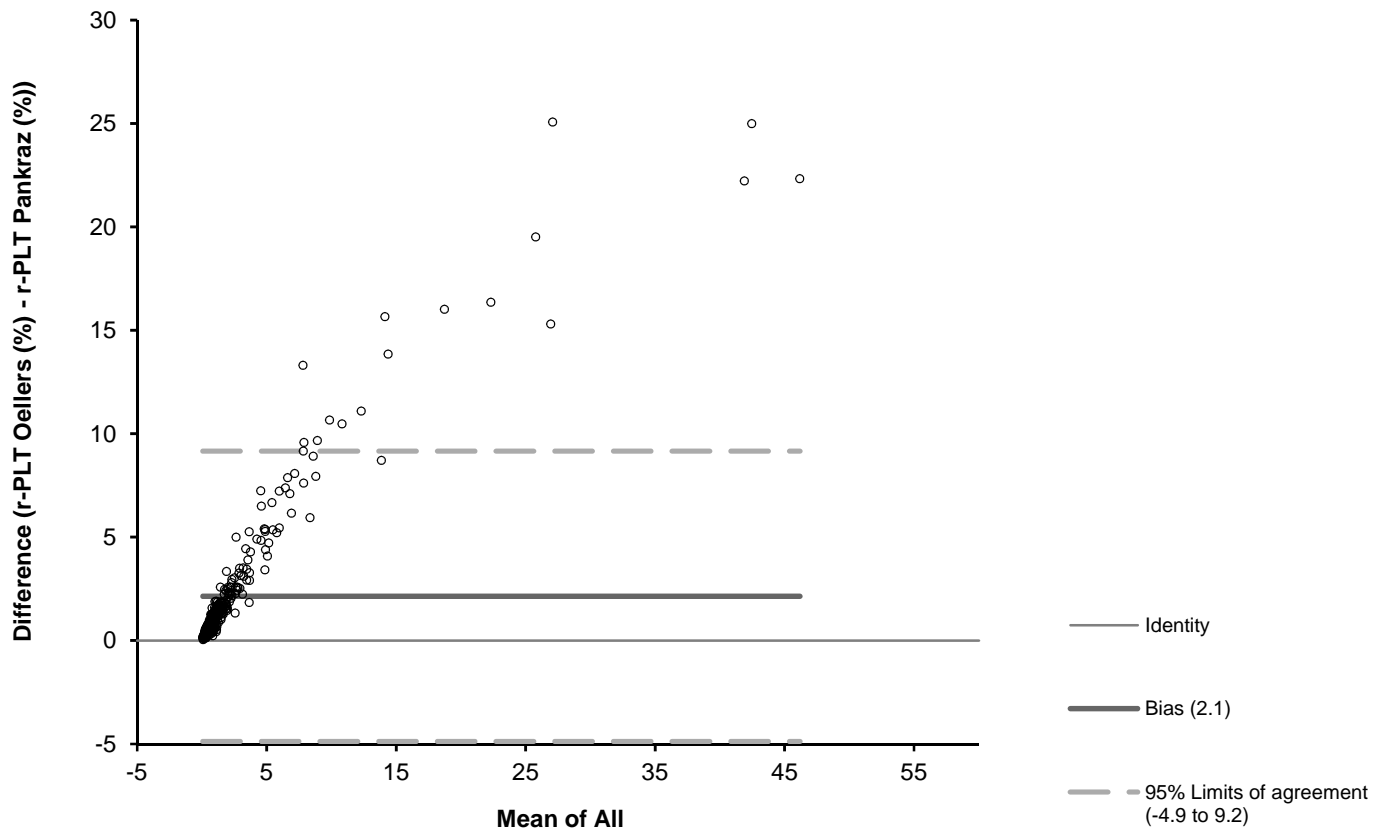


Test | **Agreement - Altman Bland test**

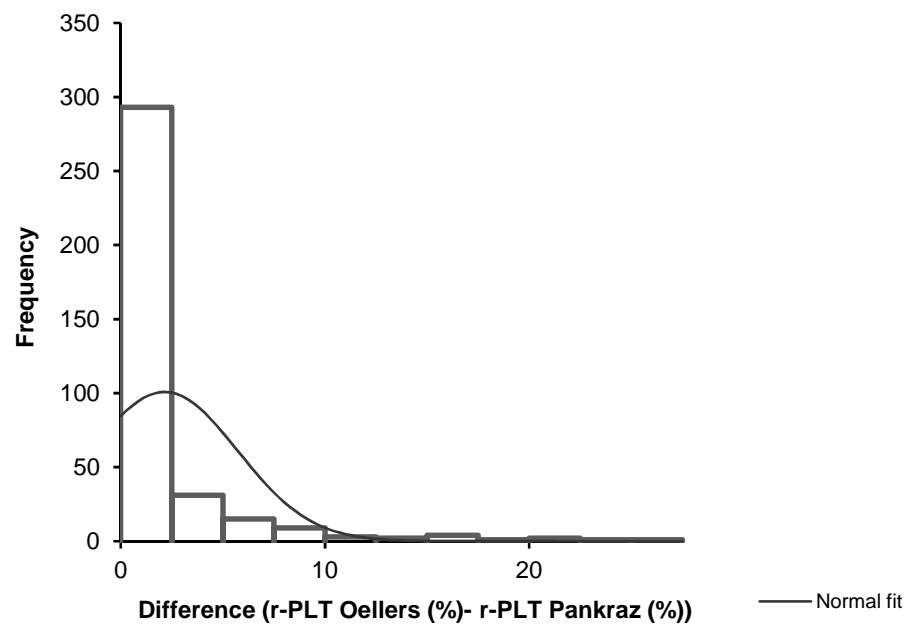
Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Difference Plot



Histogram of Differences



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013

n | 362

Range | 0,000 to 35,020

Replicates

r-PLT Pankraz (%)	1
r-PLT Oellers (%)	1

Bias

95% CI

Constant	0,17	0,10 to 0,22
Proportional	2,92	2,78 to 3,11

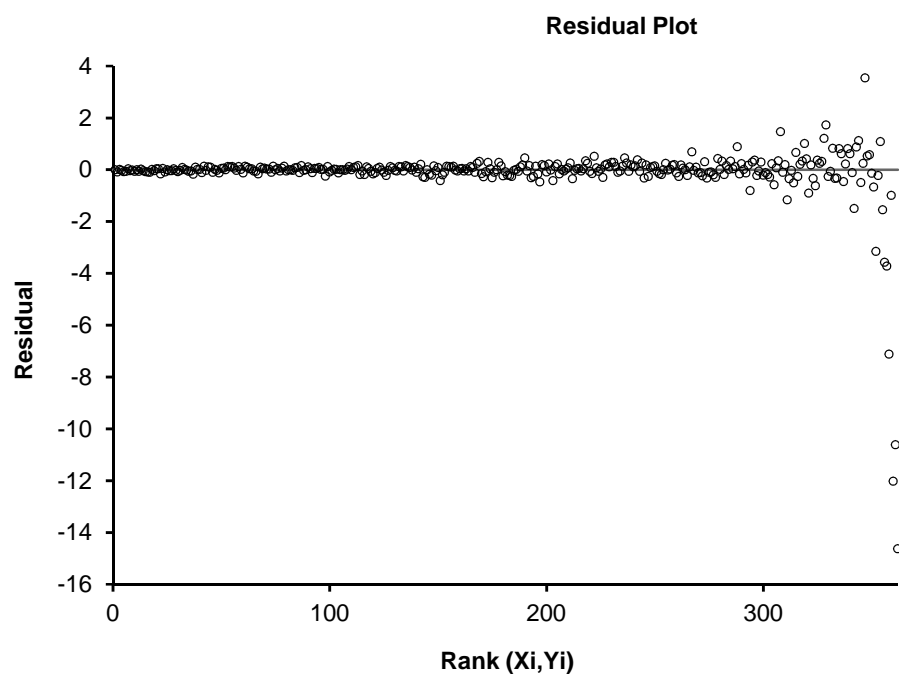
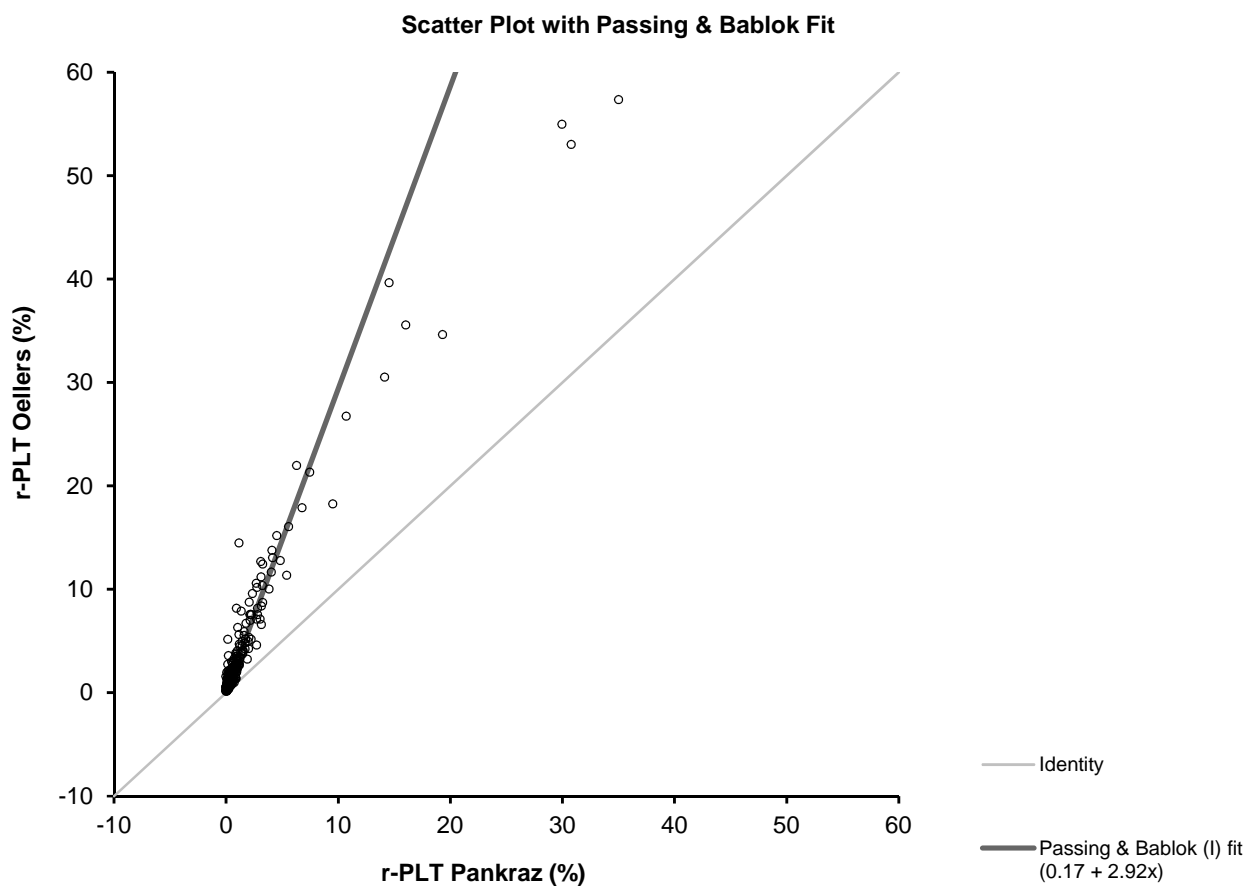
H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v r-PLT Oellers (%) XT
Hochschulrechenzentrum

Date | 11 September 2013



Methodenvergleich

Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates zu den r-PLT-Werten des ADVIA 120/2120

- Vergleich des r-PLT-**Gates A des XT-2000iV** mit dem r-PLT-**Gate des ADVIA 120/2120**

Test | **Correlation - Spearman**

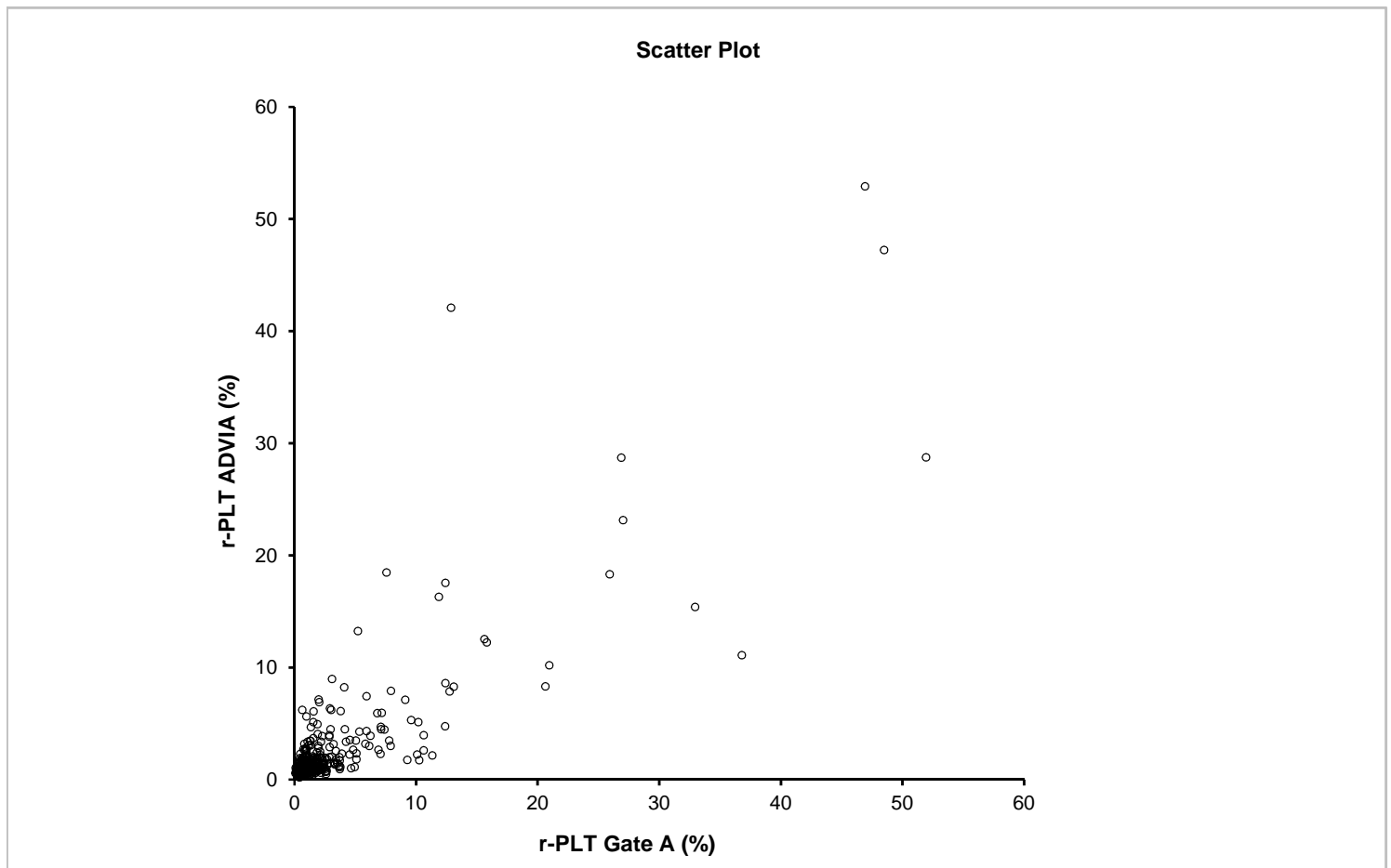
Performed by | r-PLT Gate A XT (%) v r-PLT ADVIA (%). rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,60
95% CI | 0,53 to 0,66 (normal approximation)

t statistic | 14,09
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gate A XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,71

Bias | 0
95% CI | -1 to 0
SE | 0,2

t statistic | -1,85
DF | 361
p | 0,0657

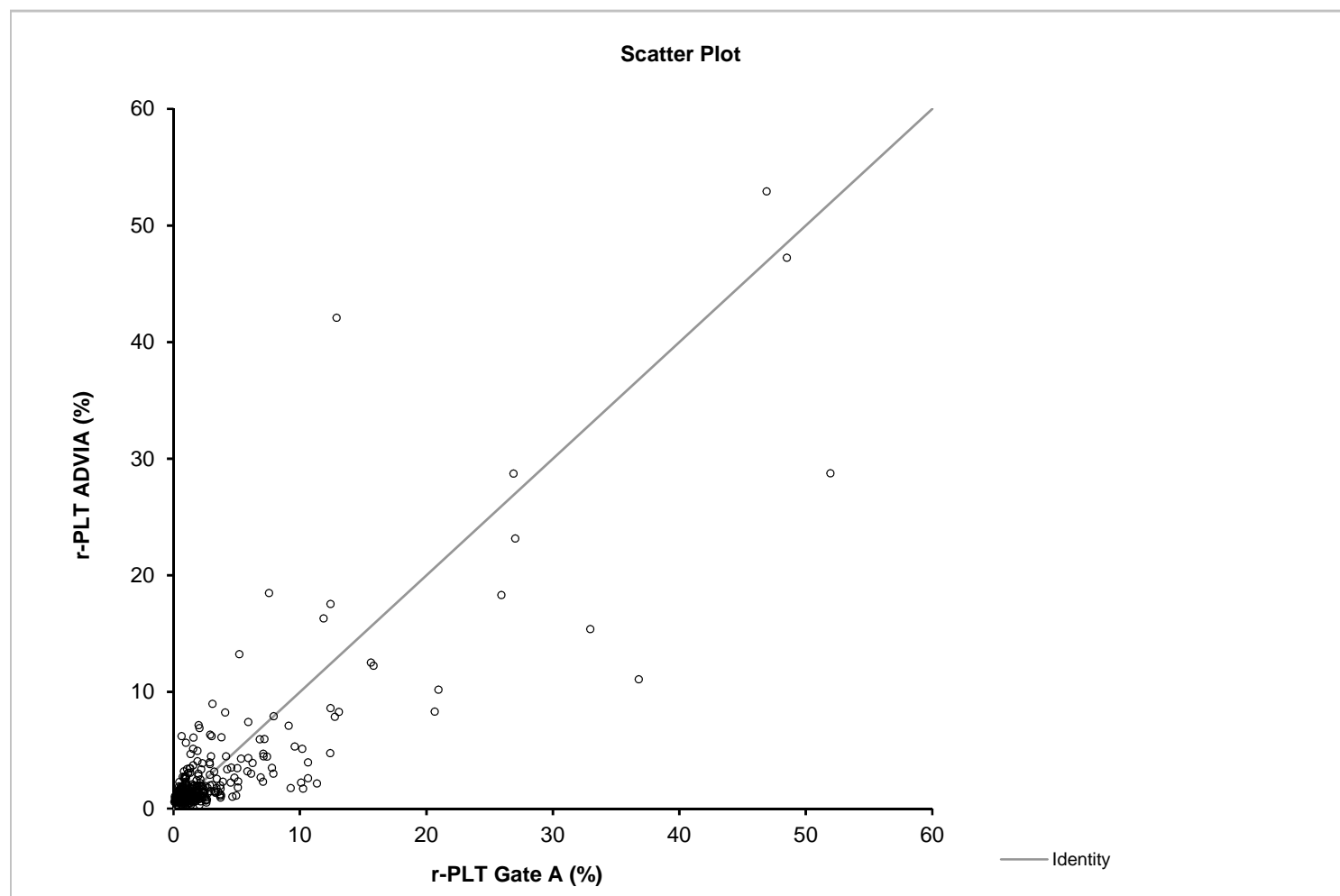
SD of differences | 3 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-7	-8 to -6
Upper	6	6 to 7

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gate A XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

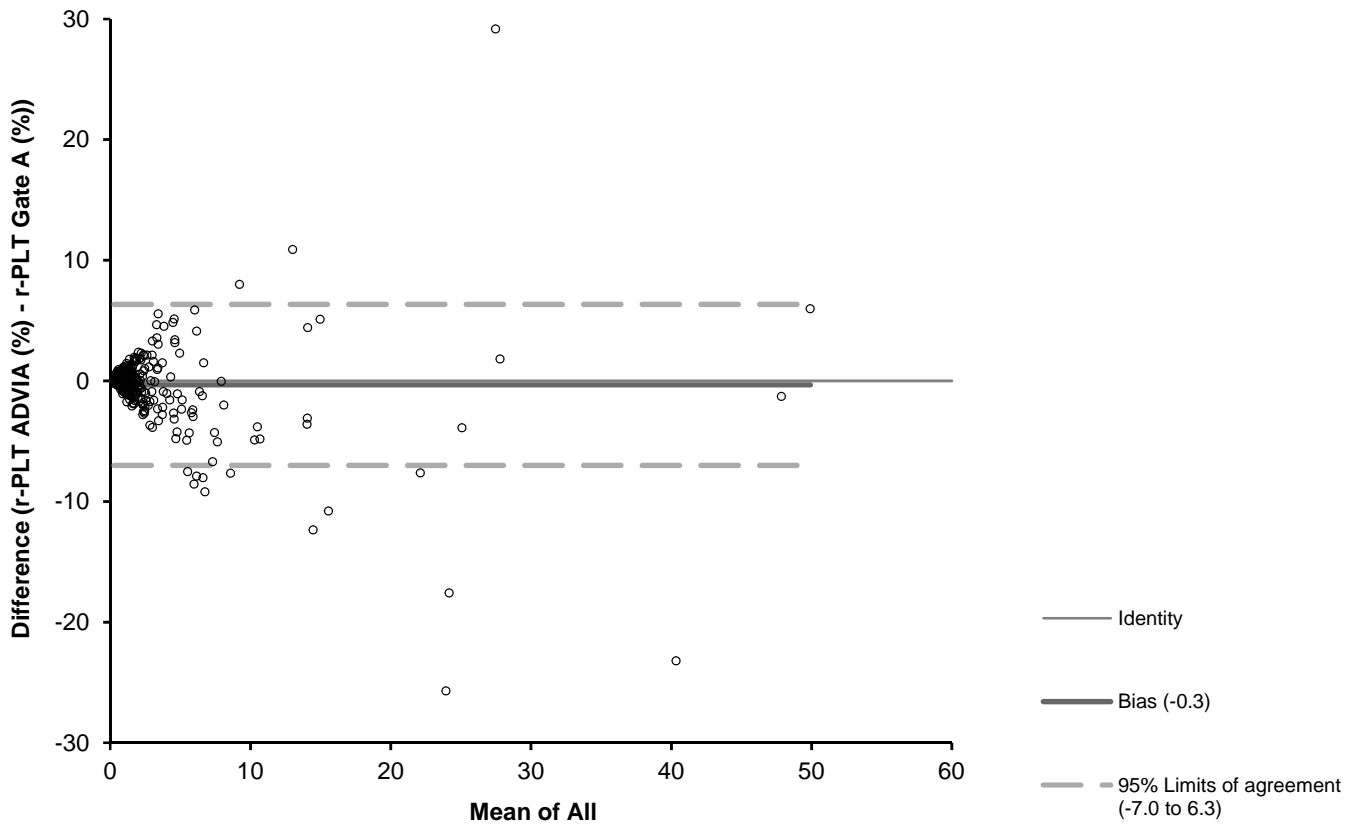


Test | **Agreement - Altman Bland test**

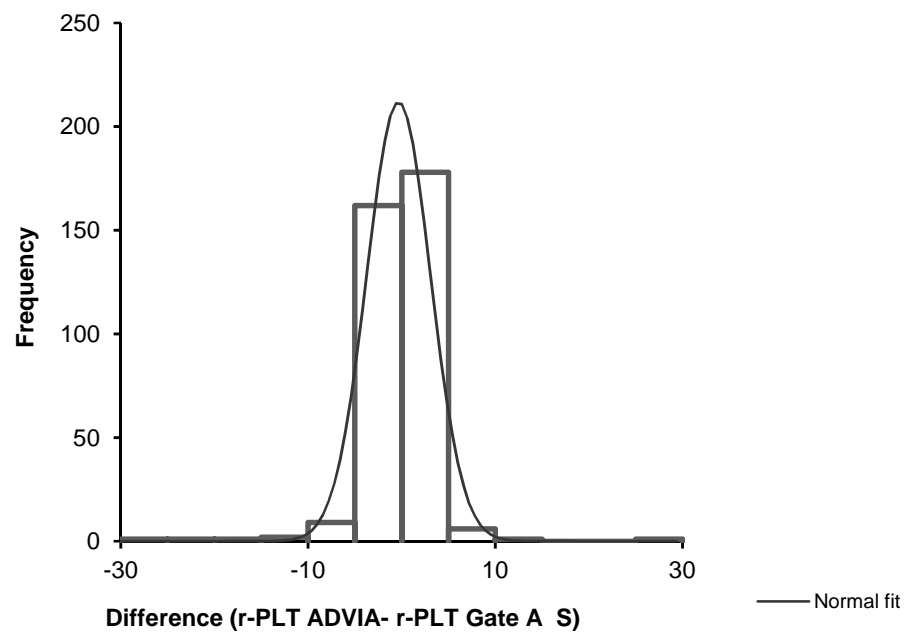
Performed by | r-PLT Gate A XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

Difference Plot



Histogram of Differences



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gate A XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Gate A XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Range | 0,080 to 51,950

Replicates

r-PLT Gate A (%)	1
r-PLT ADVIA (%)	1

Bias

95% CI

Constant	0,36	0,26 to 0,48
Proportional	0,69	0,61 to 0,79

H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

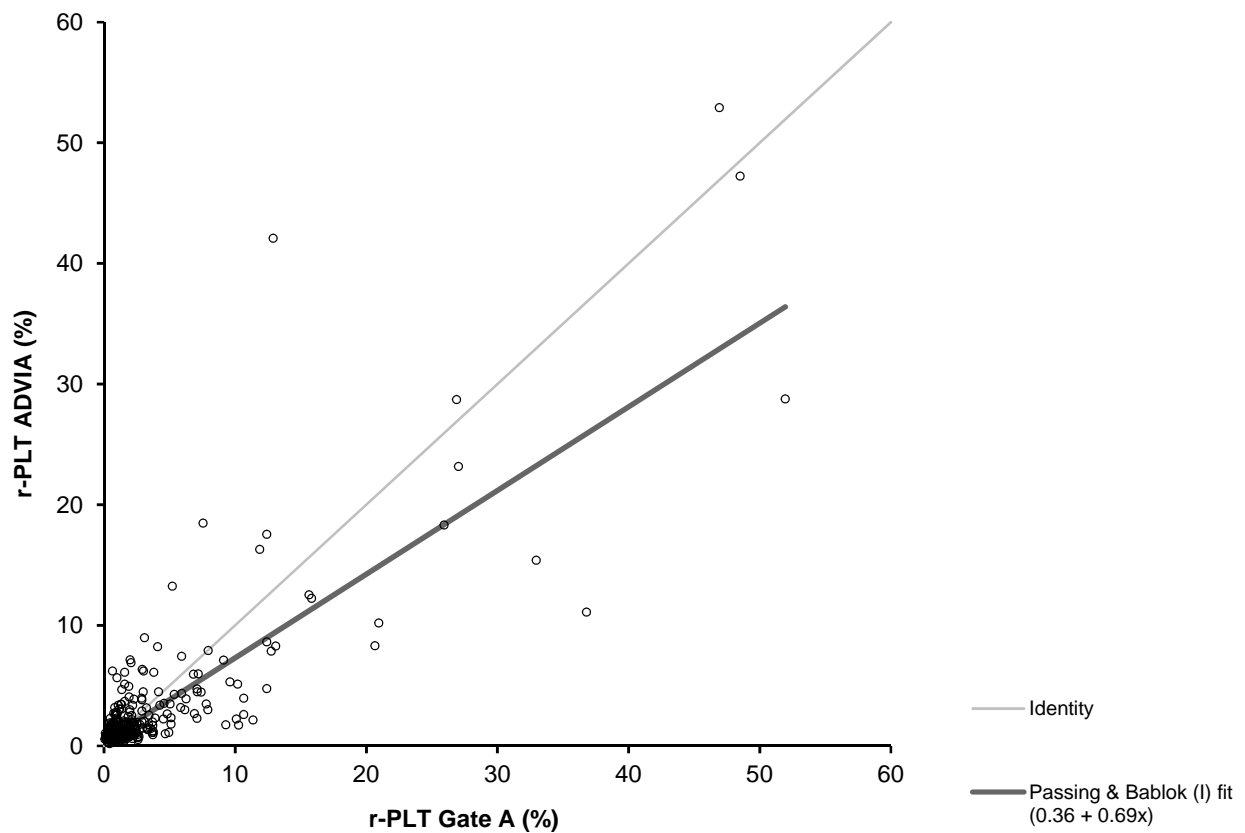
H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

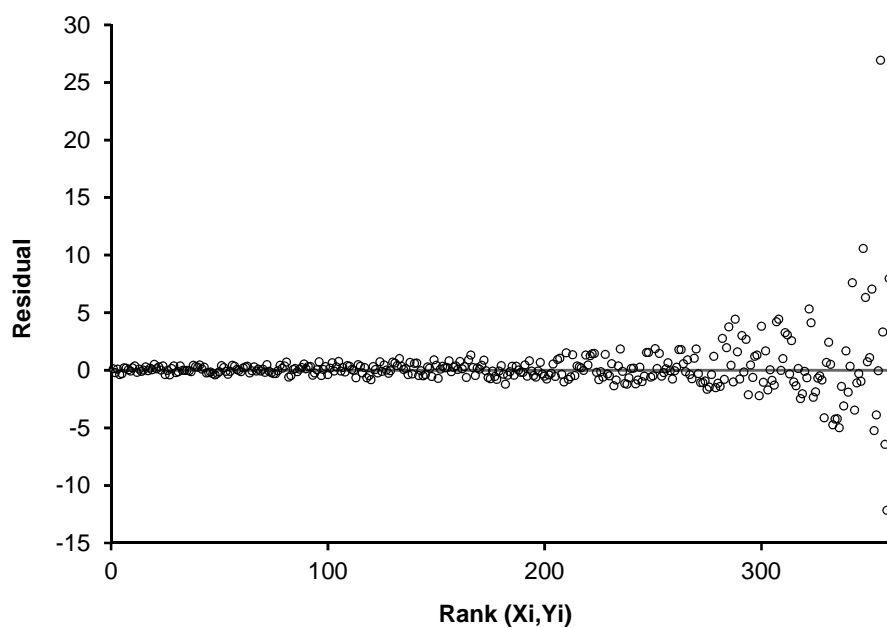
Performed by | r-PLT Gate A XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

Scatter Plot with Passing & Bablok Fit



Residual Plot



Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates zu den r-PLT-Werten des ADVIA 120/2120

- Vergleich des r-PLT-**Gates nach Gelain et al. des XT-2000iV** mit dem r-PLT-**Gate des ADVIA 120/2120**

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Gelatin XT (%) v r-PLT ADVIA (%). $r_s \neq 0$
Hochschulrechenzentrum

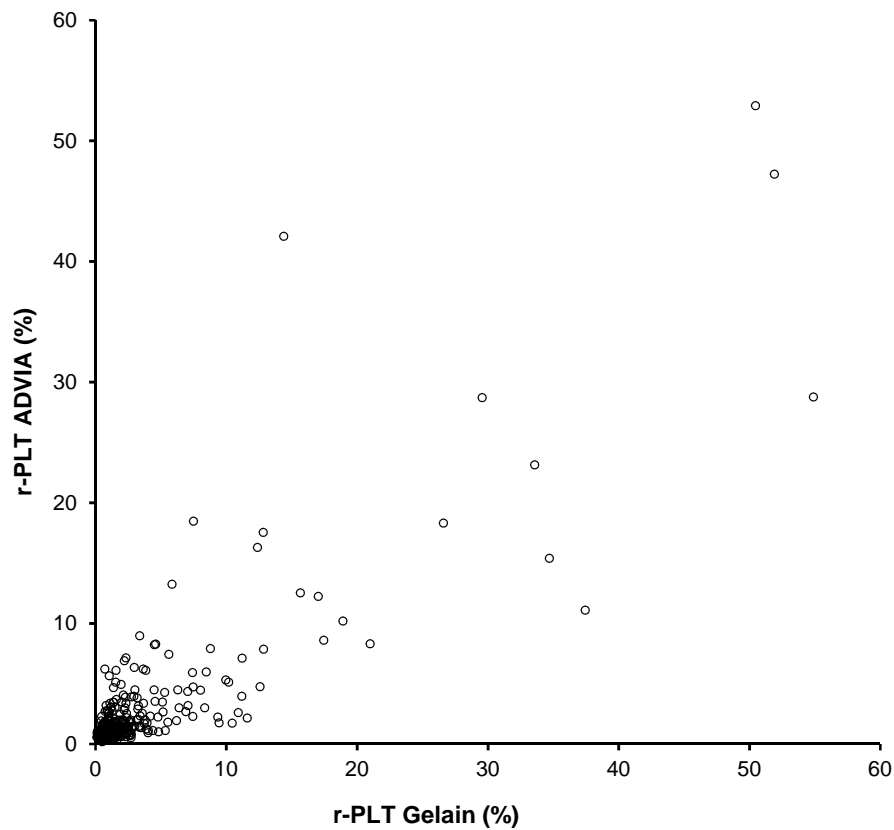
Date | 13 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,60
95% CI | 0,53 to 0,66 (normal approximation)

t statistic | 14,28
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelain XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,71

Bias | 0
95% CI | -1 to -0
SE | 0,2

t statistic | -2,49
DF | 361
p | 0,0132

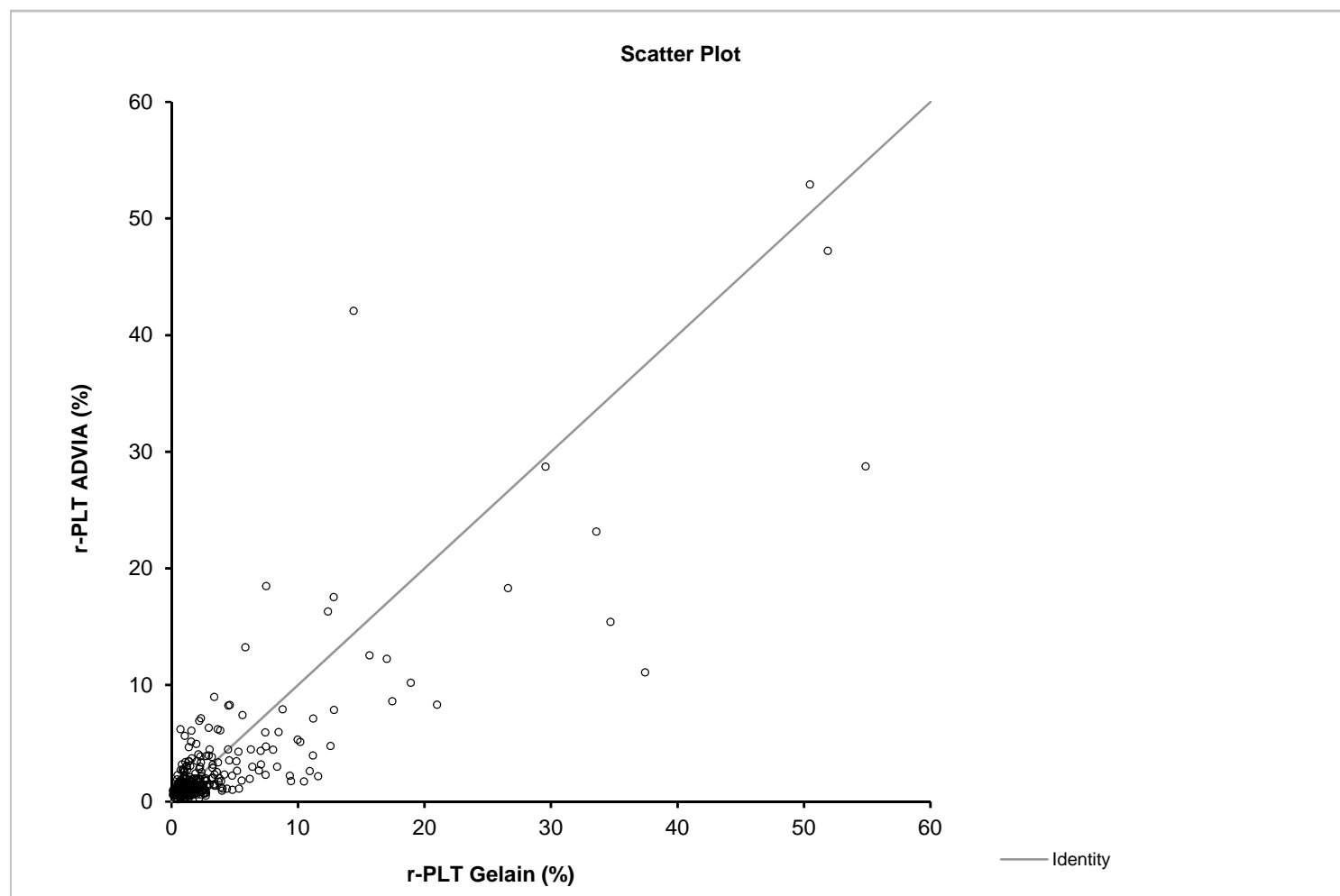
SD of differences | 4 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-7	-8 to -7
Upper	6	6 to 7

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelatin XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

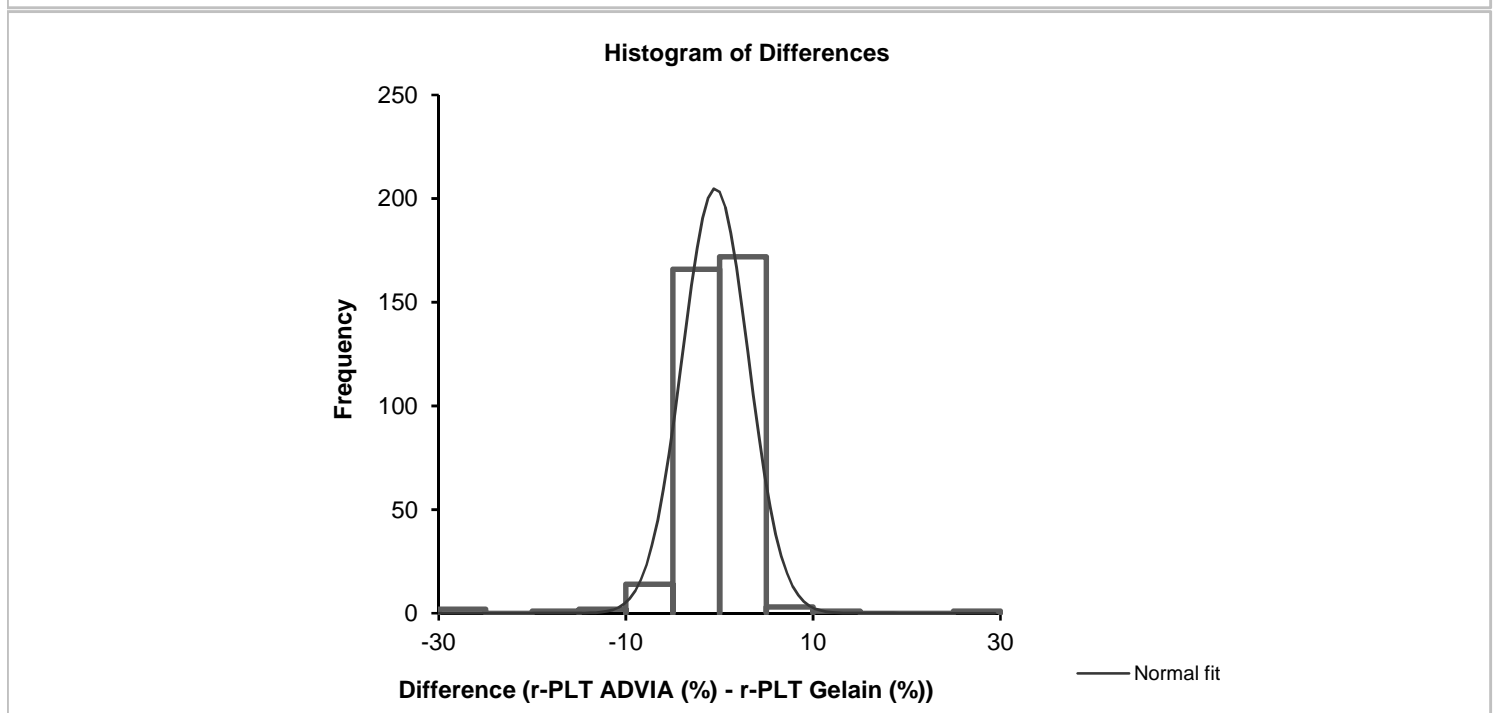
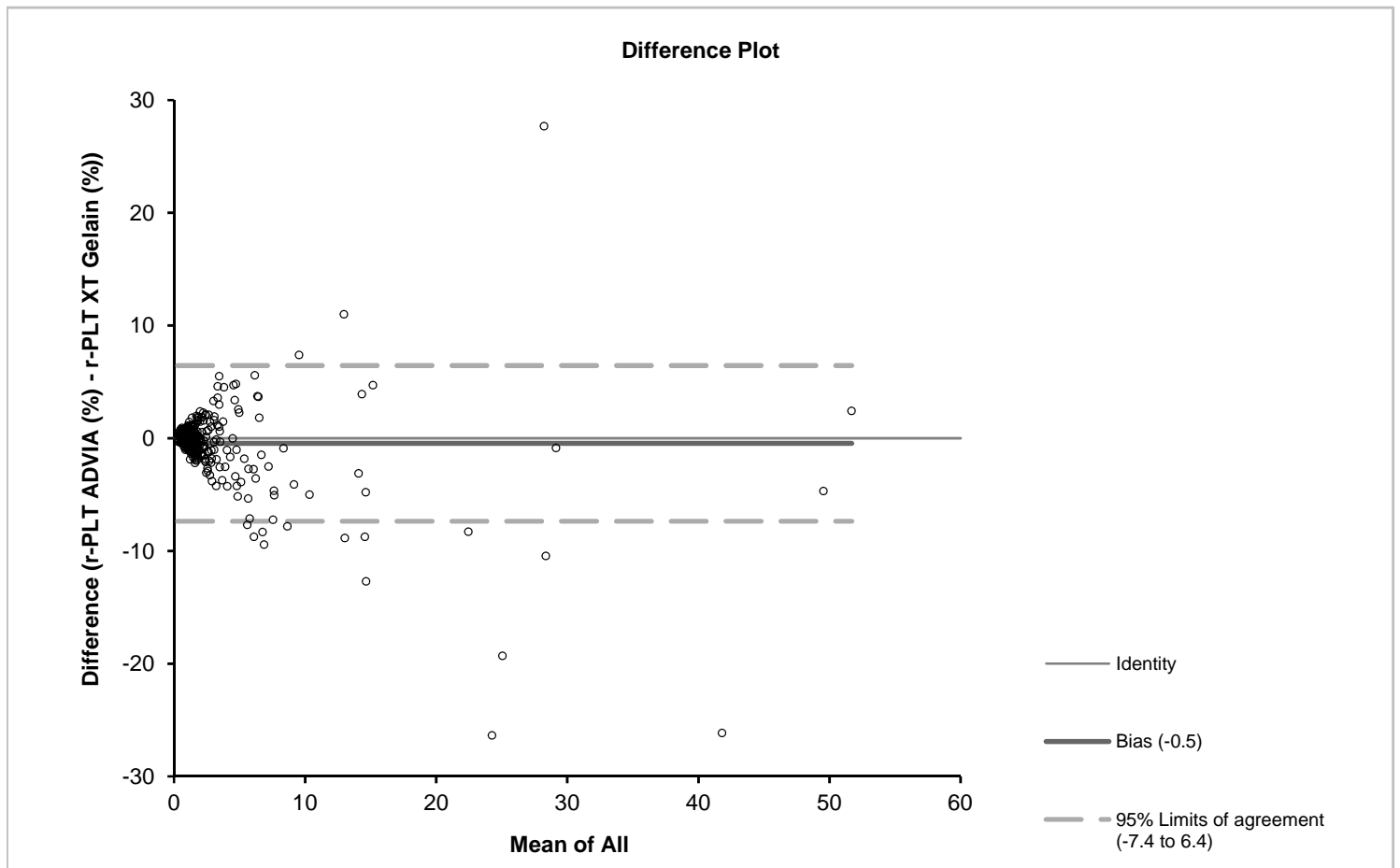
Date | 13 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelatin XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Gelain XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Gelain XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Range | 0,110 to 54,890

Replicates

r-PLT Gelain	1
r-PLT ADVIA	1

Bias

95% CI

Constant	0,36	0,26 to 0,46
Proportional	0,68	0,59 to 0,77

H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

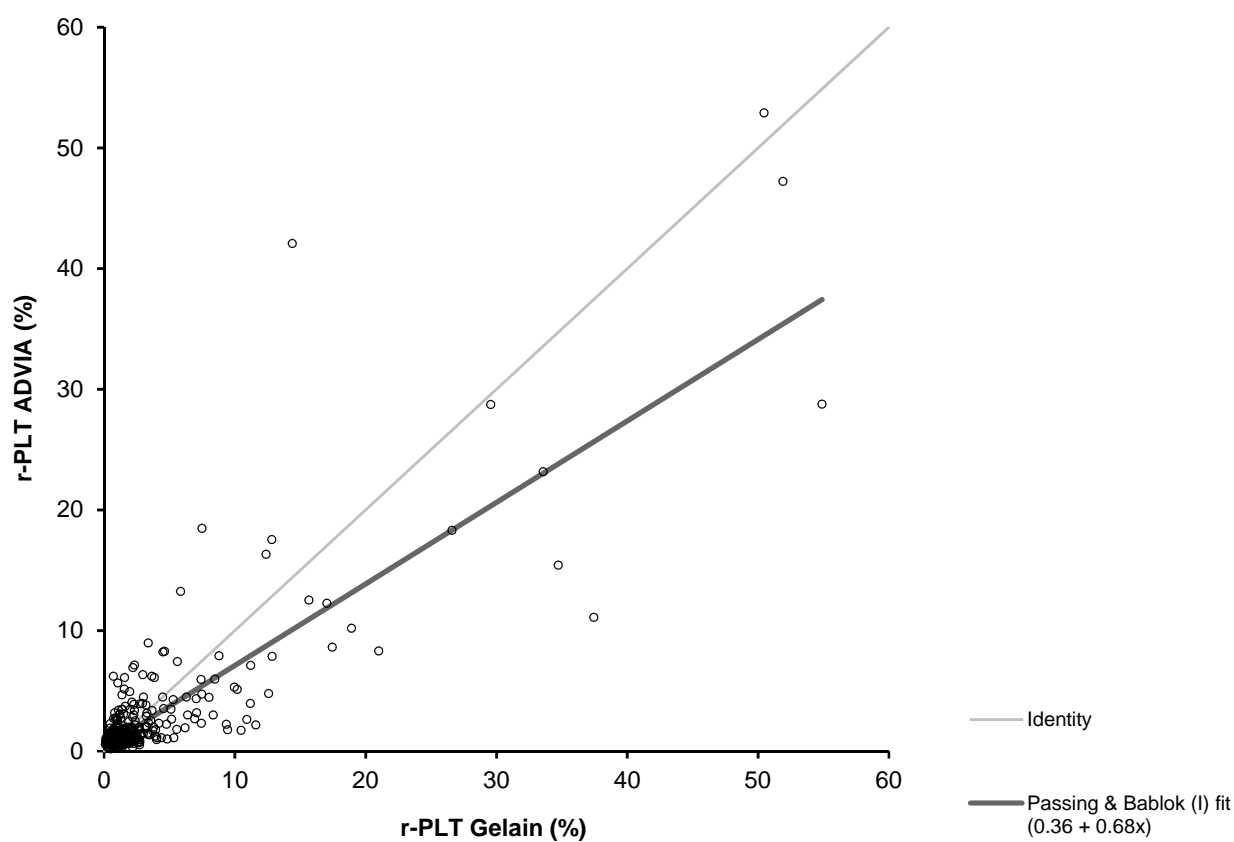
H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

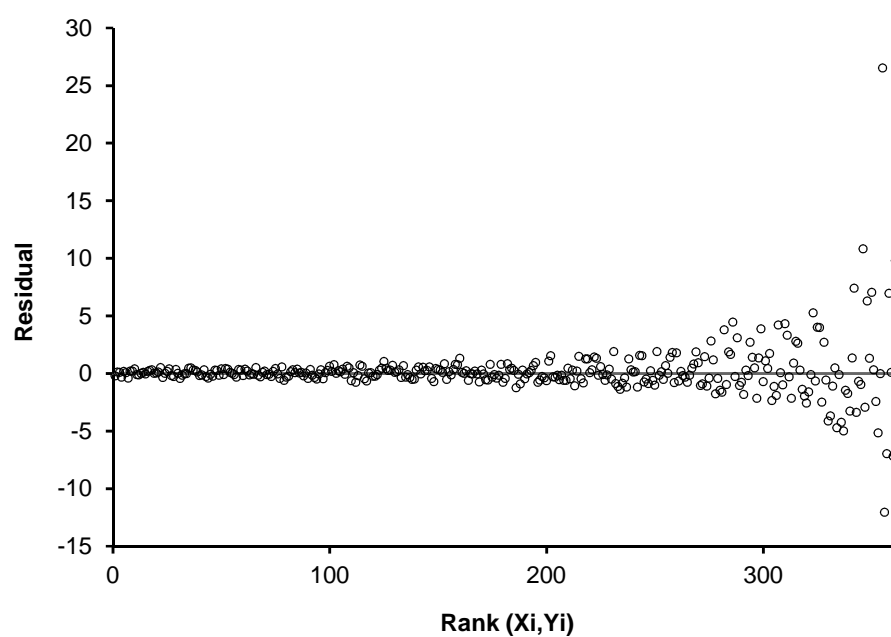
Performed by | r-PLT Gelatin XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

Scatter Plot with Passing & Bablok Fit



Residual Plot



Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates zu den r-PLT-Werten des ADVIA 120/2120

- Vergleich des r-PLT-**Gates nach Pankraz et al. des XT-2000iV** mit dem r-PLT-**Gate des ADVIA 120/2120**

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) v r-PLT ADVIA (%). rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

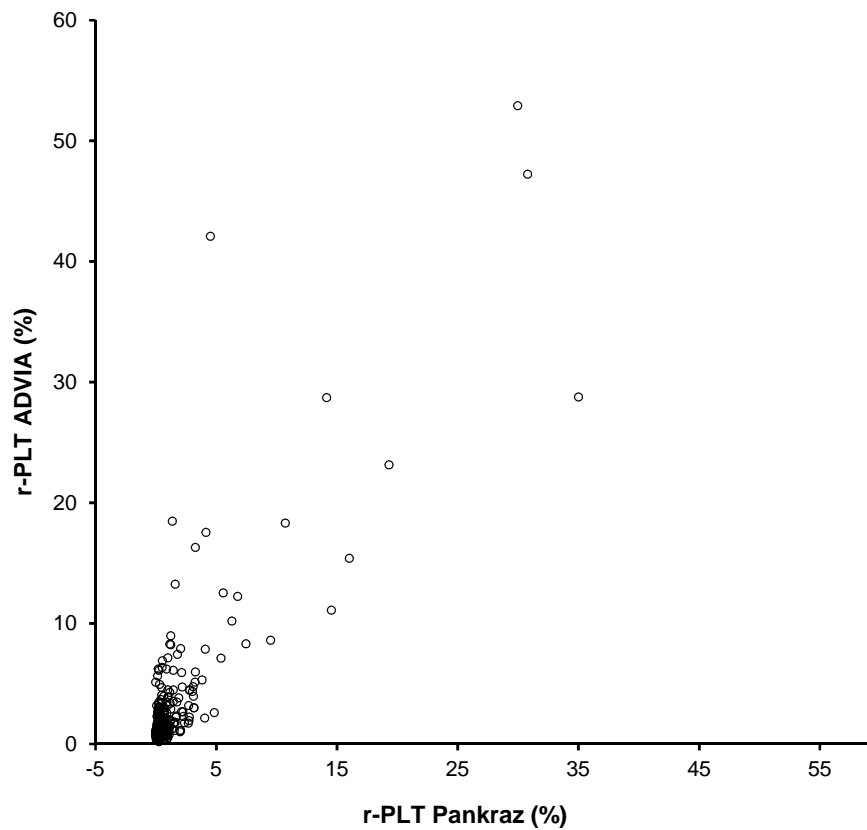
Date | 13 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,55
95% CI | 0,47 to 0,62 (normal approximation)

t statistic | 12,47
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,64

Bias | 2
95% CI | 1 to 2
SE | 0,2

t statistic | 9,19
DF | 361
p | <0.0001

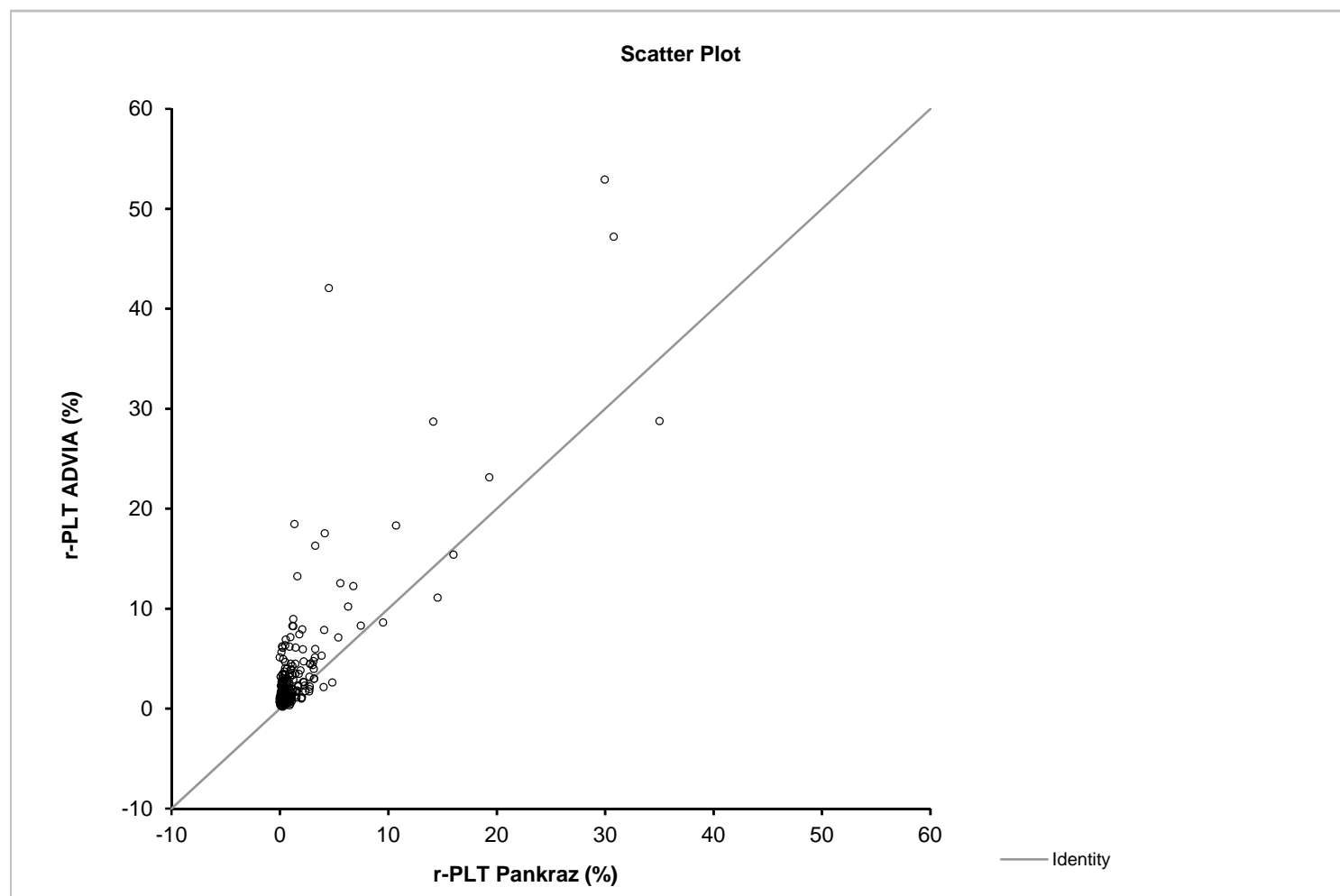
SD of differences | 3 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-5	-5 to -4
Upper	8	7 to 8

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

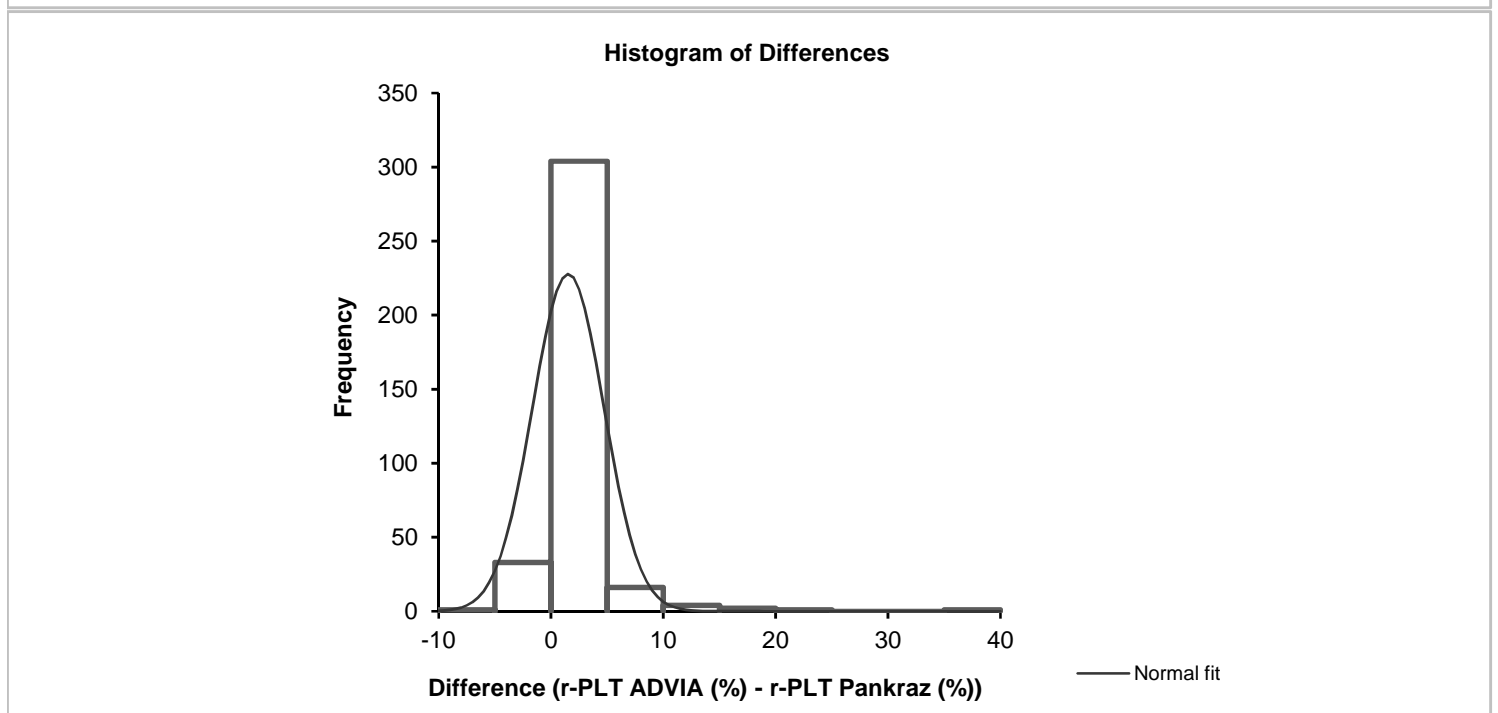
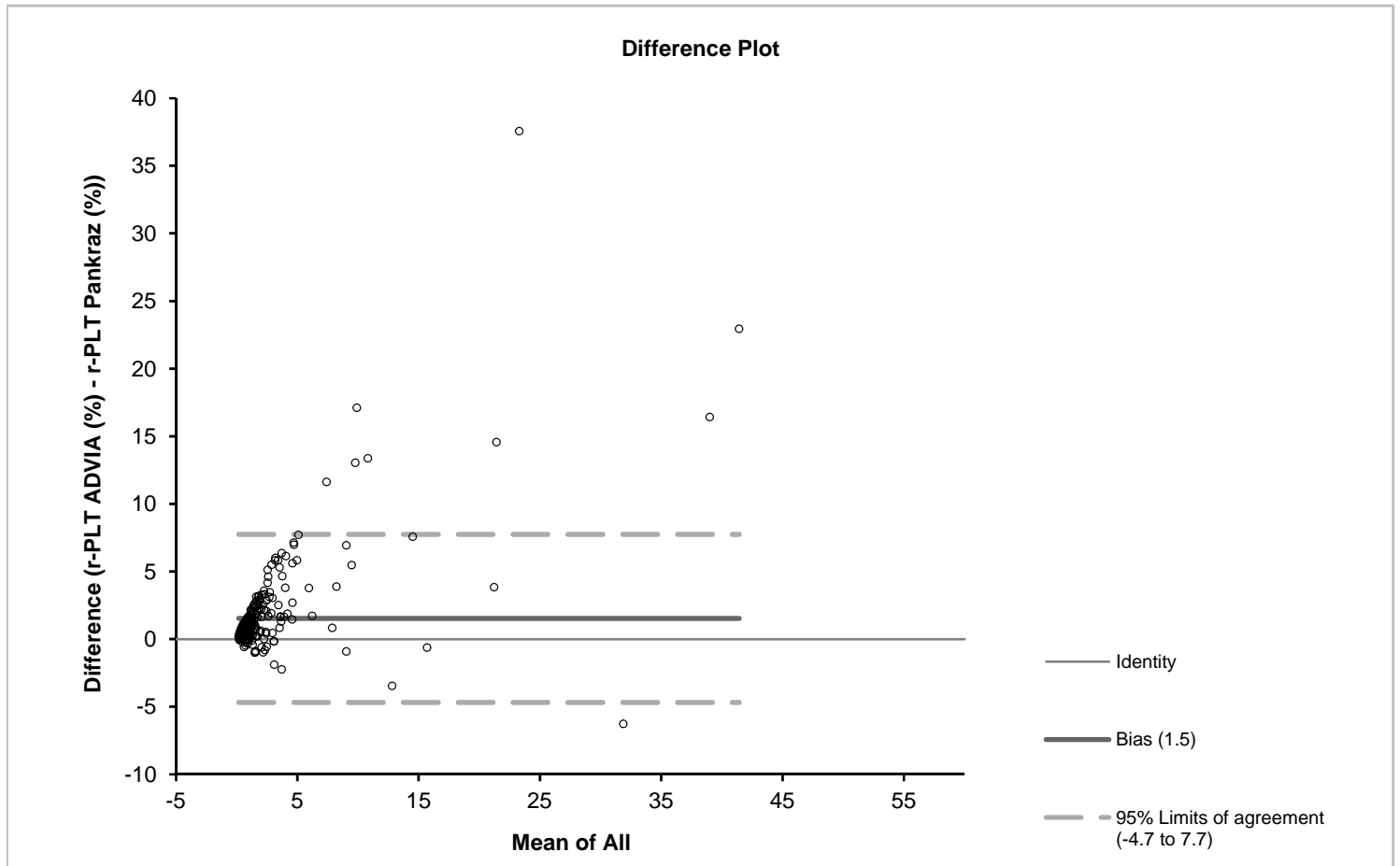
Date | 13 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Range | 0,000 to 35,020

Replicates

r-PLT Pankraz	1
r-PLT ADVIA	1

Bias

95% CI

Constant	0,31	0,14 to 0,42
Proportional	2,42	2,00 to 3,03

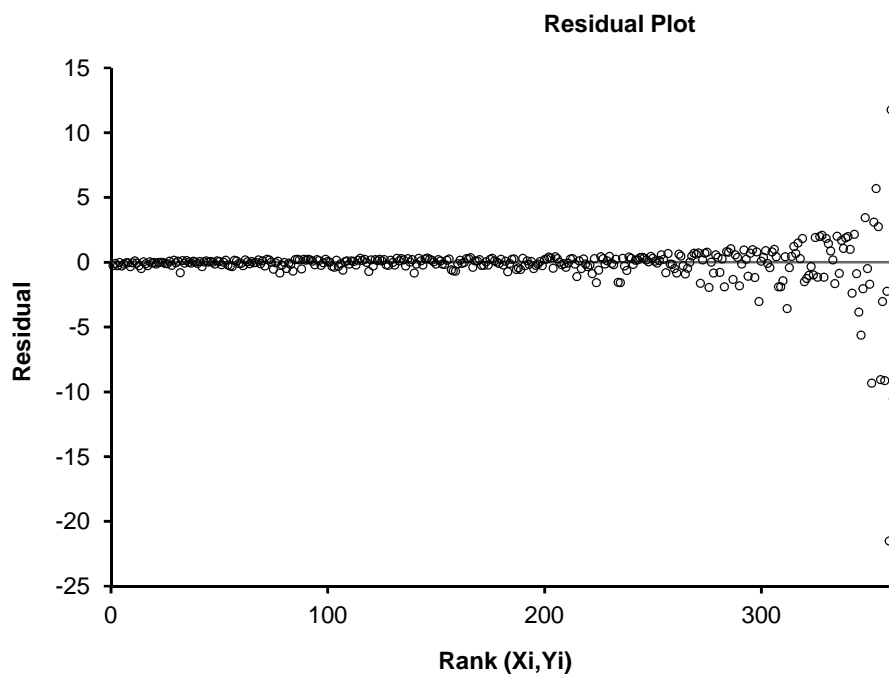
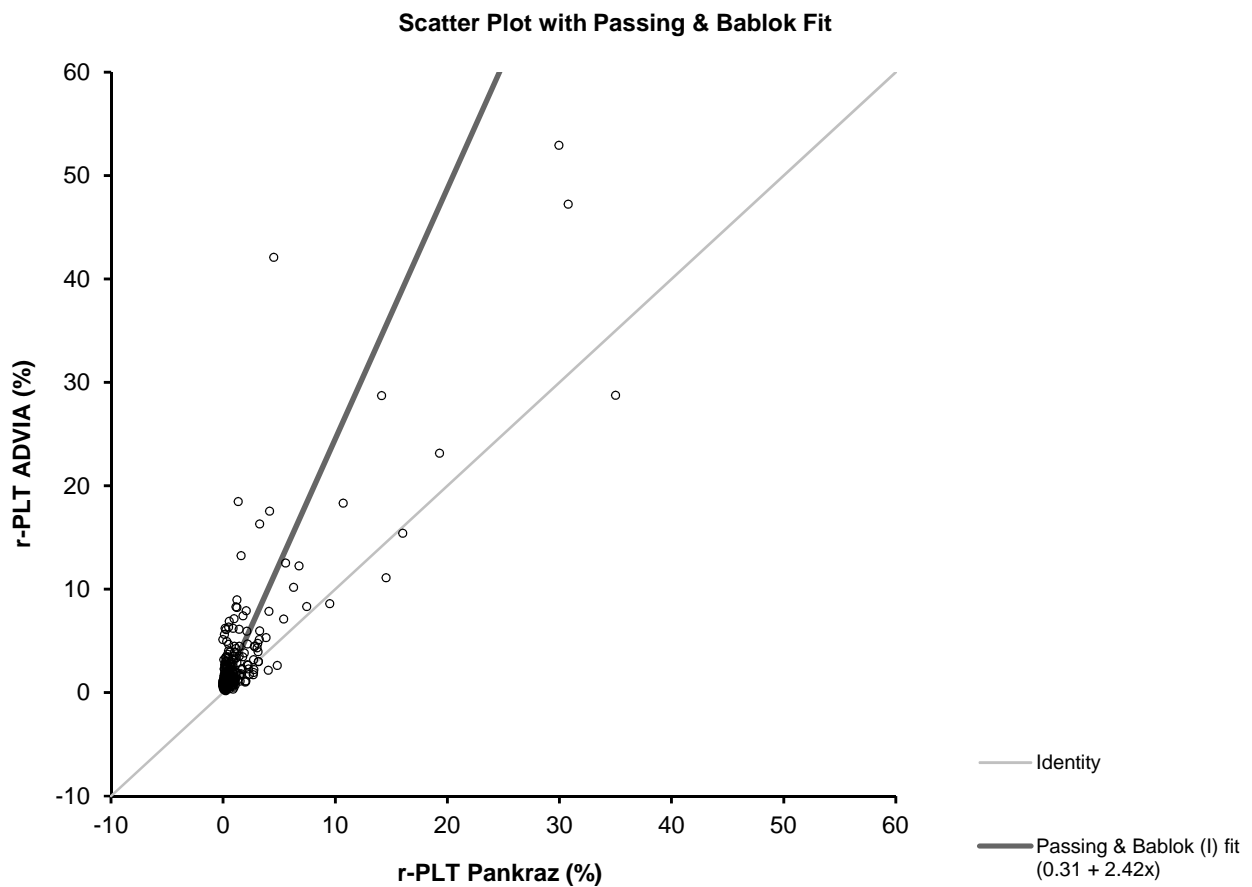
H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013



Spearman-Korrelation, Bland-Altman-Analyse und Passing-Bablok-Regression

relative r-PLT-Werte der verschiedenen XT-2000iV-Gates zu den r-PLT-Werten des ADVIA 120/2120

- Vergleich des r-PLT-**Gates nach Oellers et al. des XT-2000iV** mit dem r-PLT-**Gate des ADVIA 120/2120**

Test | **Correlation - Spearman**

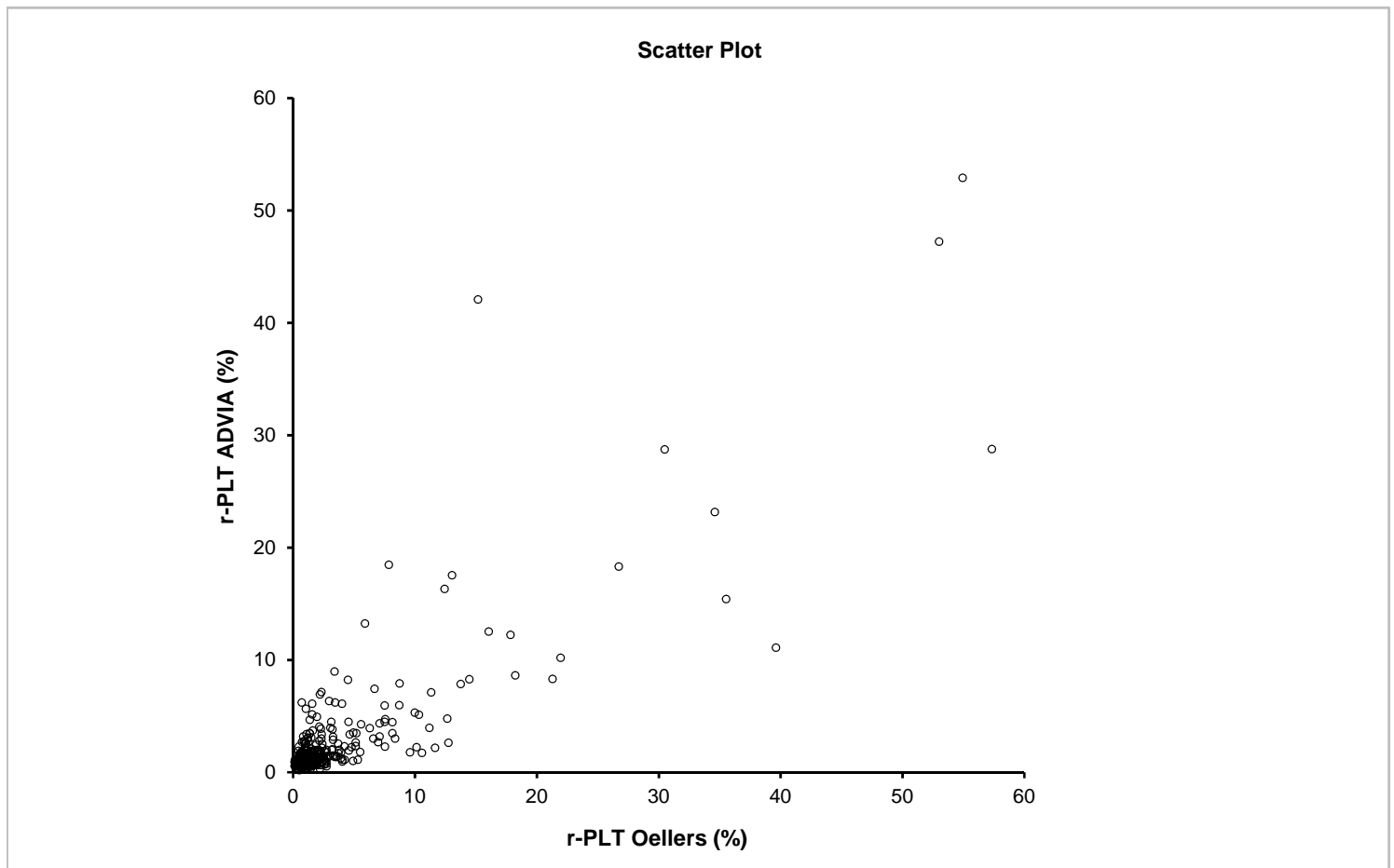
Performed by | r-PLT Oellers XT (%) v r-PLT ADVIA (%). rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,60
95% CI | 0,53 to 0,67 (normal approximation)

t statistic | 14,40
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Oellers XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Correlation - absolute
difference v average | 0,73

Bias | -1
95% CI | -1 to -0
SE | 0,2

t statistic | -3,15
DF | 361
p | 0,0018

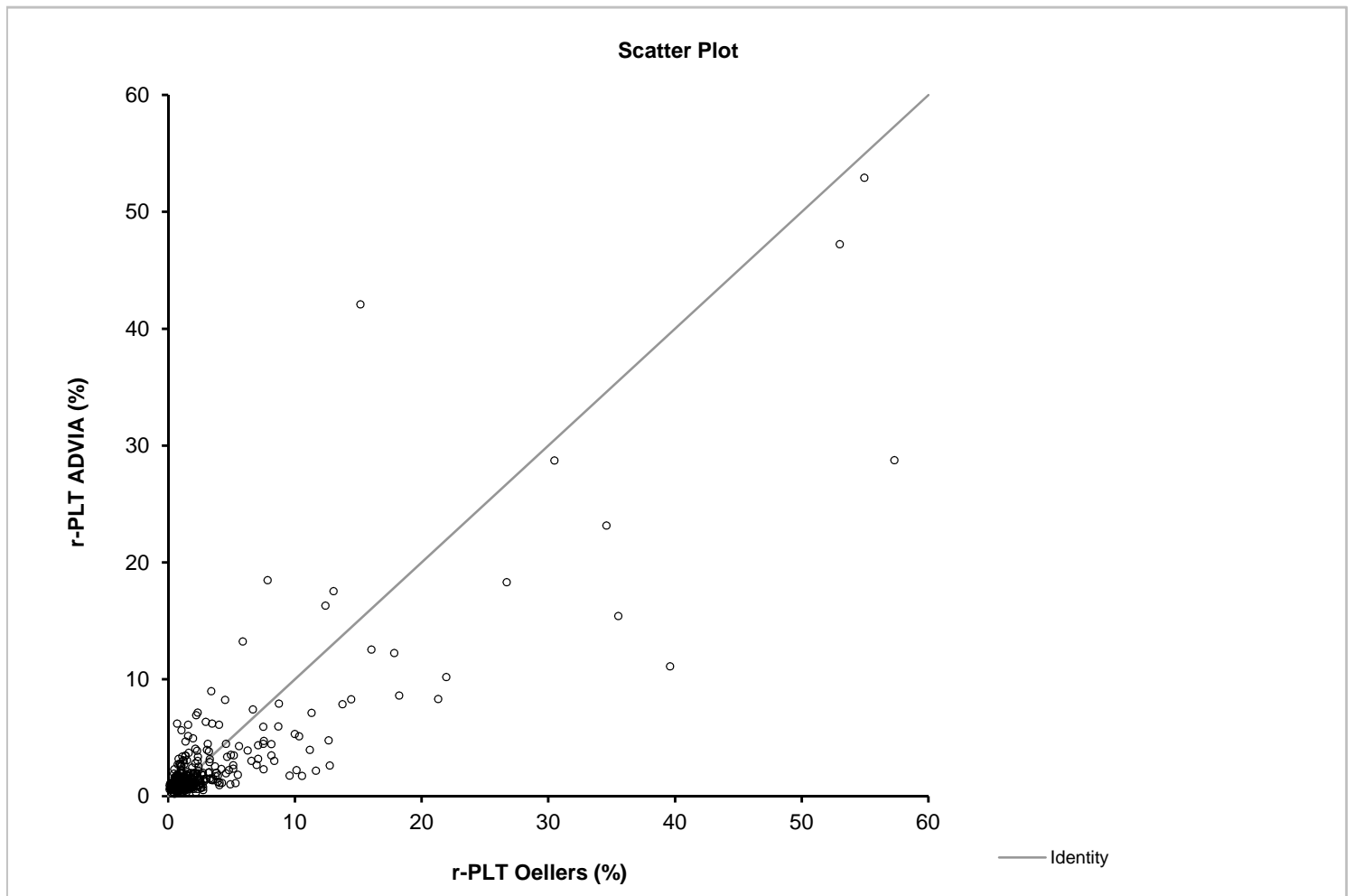
SD of differences | 4 between single measurements

	95% Limits of agreement	95% CI
Lower	-8	-8 to -7
Upper	7	6 to 7

Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Oellers XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

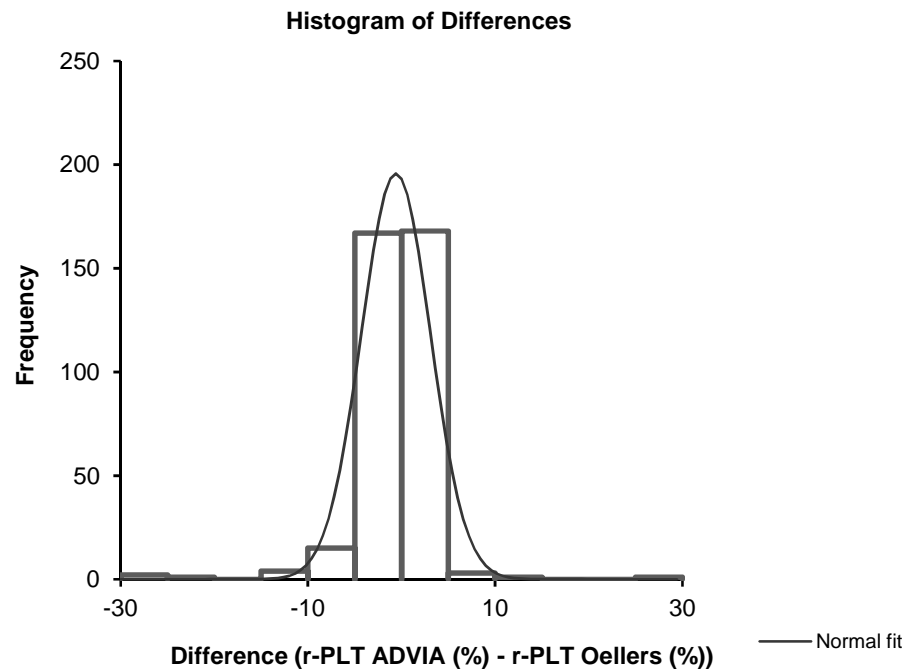
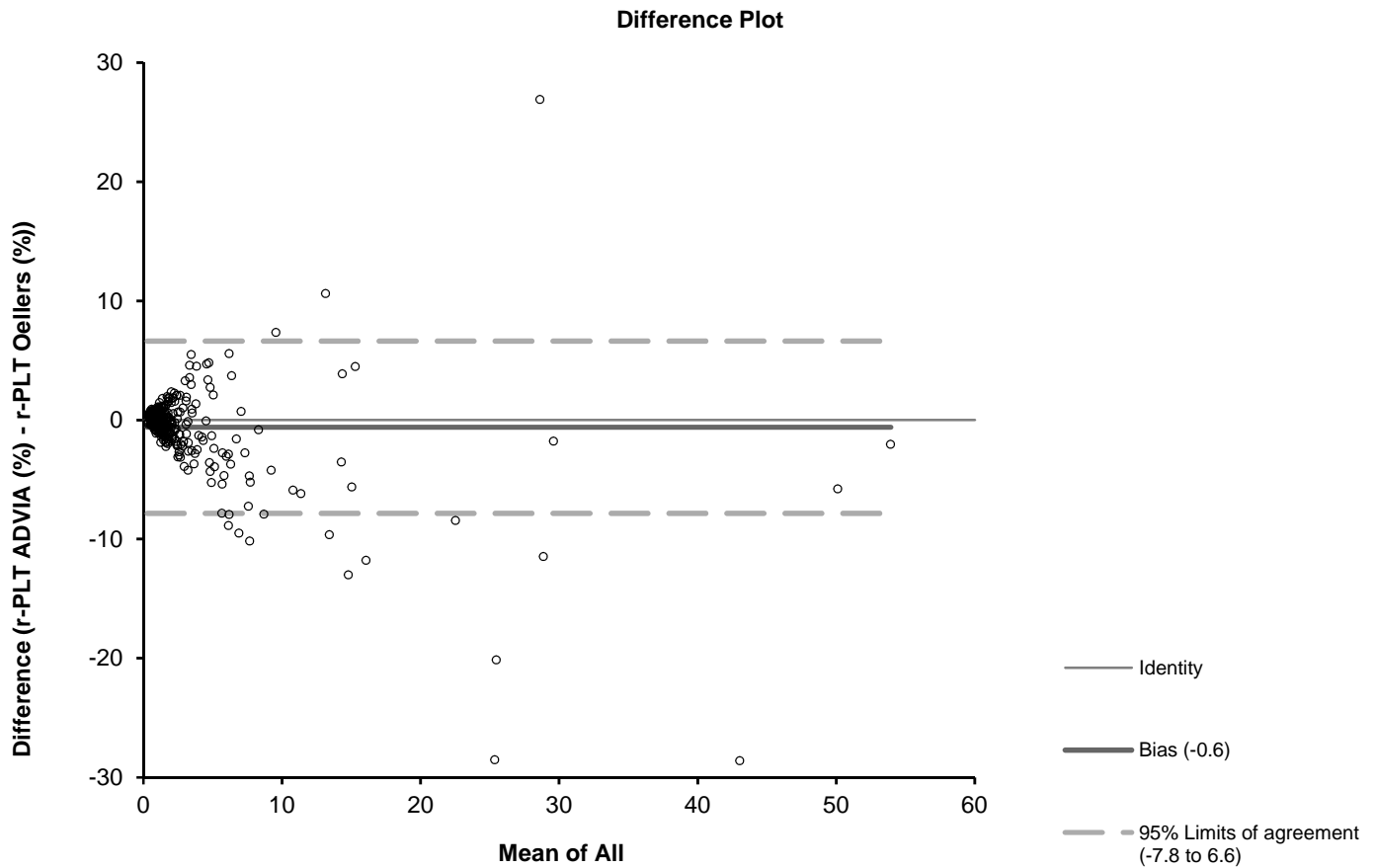
Date | 13 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**

Performed by | r-PLT Oellers XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013



Test | **Agreement - Altman Bland test**Performed by | r-PLT Oellers XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
HochschulrechenzentrumDate | 13 September 2013

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

Performed by | r-PLT Oellers XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 362

Range | 0,120 to 57,340

Replicates

r-PLT Oellers (%)	1
r-PLT ADVIA (%)	1

Bias

95% CI

Constant	0,39	0,29 to 0,49
Proportional	0,62	0,55 to 0,70

H_0 : Constant bias = 0. H_1 : Constant bias \neq 0.

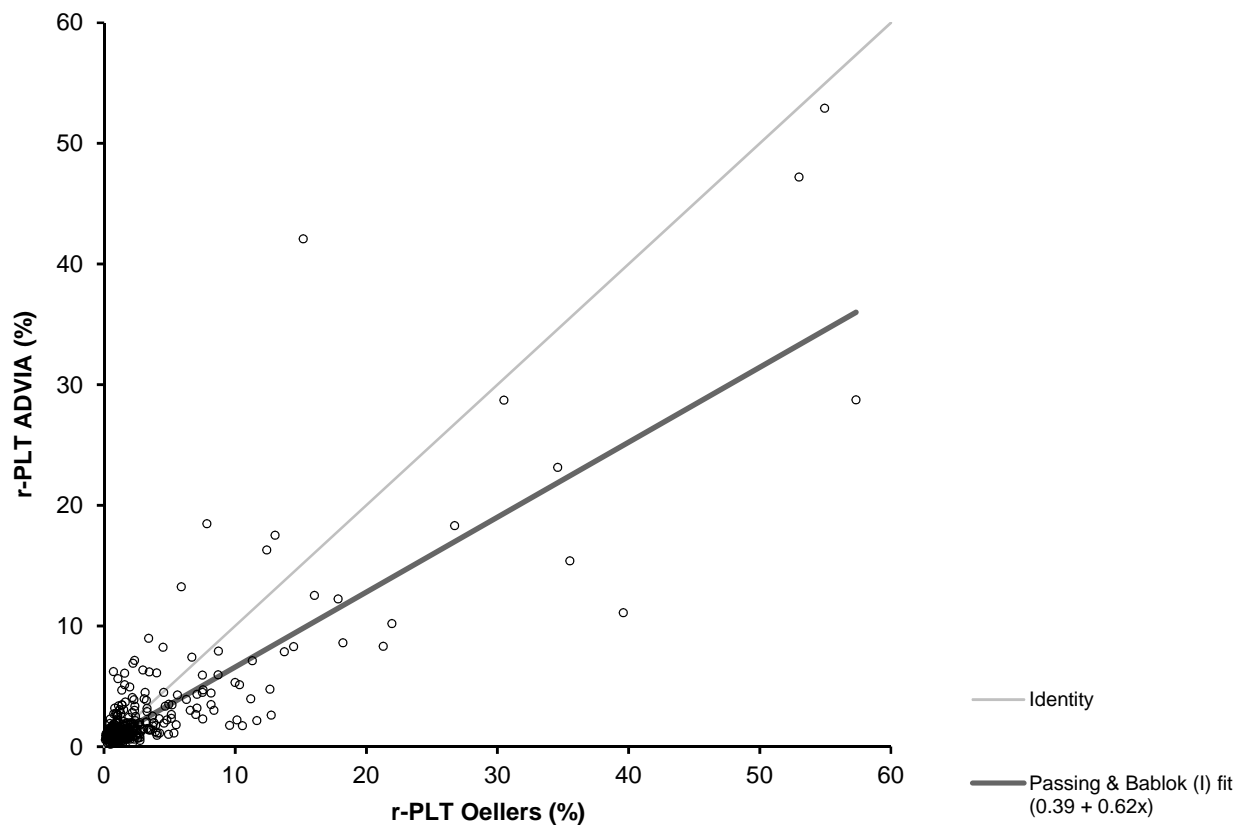
H_0 : Proportional bias = 1. H_1 : Proportional bias \neq 1.

Test | **Method Comparison - Passing & Bablok fit**

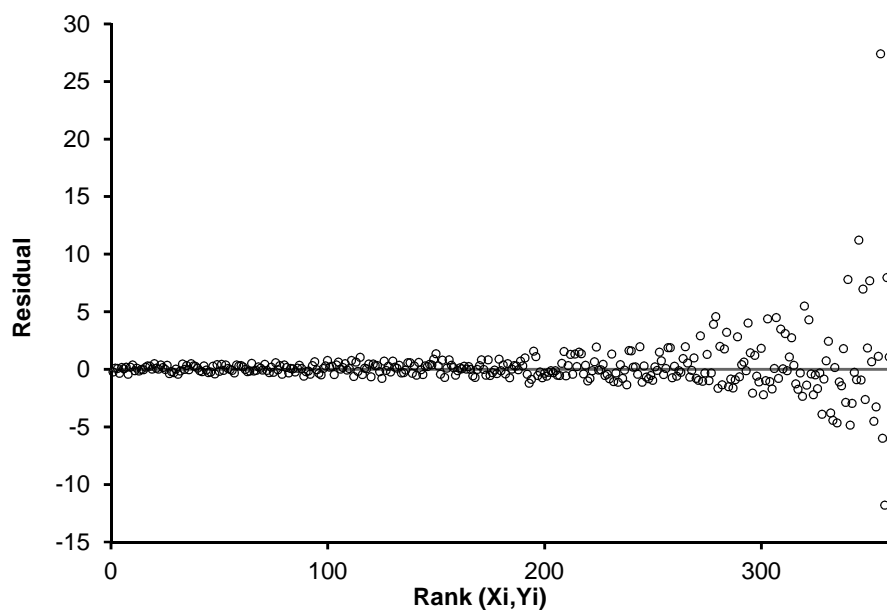
Performed by | r-PLT Oellers XT (%) v r-PLT ADVIA (%)
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

Scatter Plot with Passing & Bablok Fit



Residual Plot



Der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern

Spearman-Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern, Sysmex XT-2000iV

- Vergleich der relativen **r-PLT-Werte der Gates nach Gelain et al., Pankraz et al. und Oellers et al. des XT-2000iV** mit dem Parameter **MPV (fl)** (mittleres Zellvolumen der Thrombozyten) des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

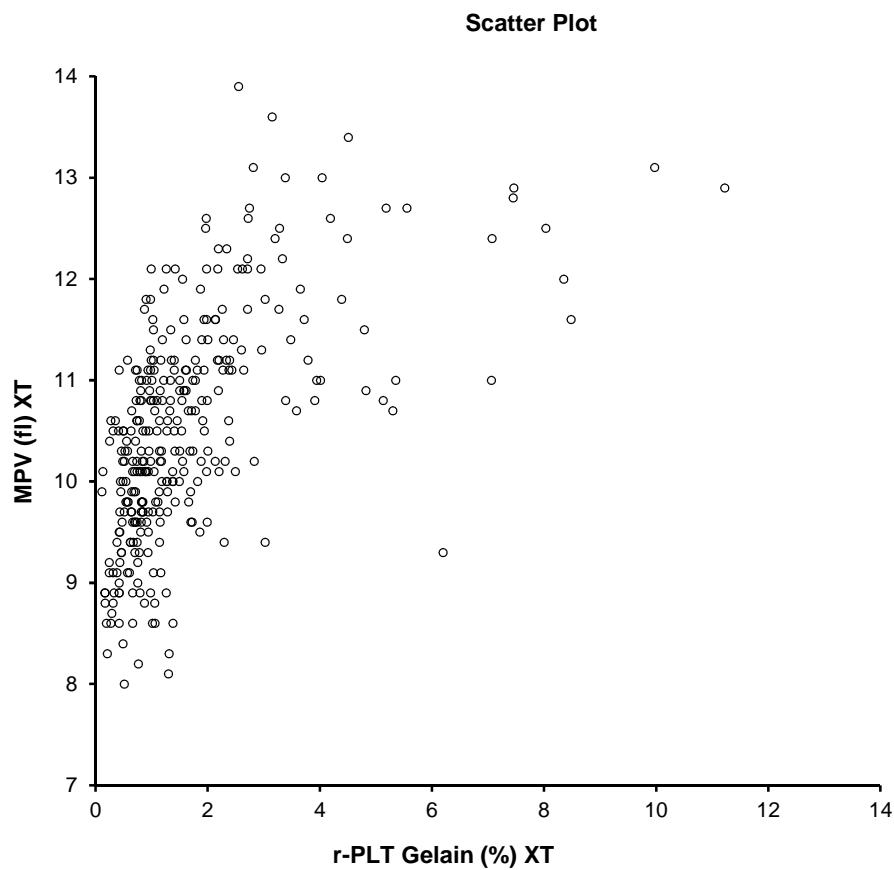
Performed by | r-PLT Gelatin (%) XT v MPV (fl) XT. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,65
95% CI | 0,58 to 0,71 (normal approximation)

t statistic | 15,14
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v MPV (fL) XT. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

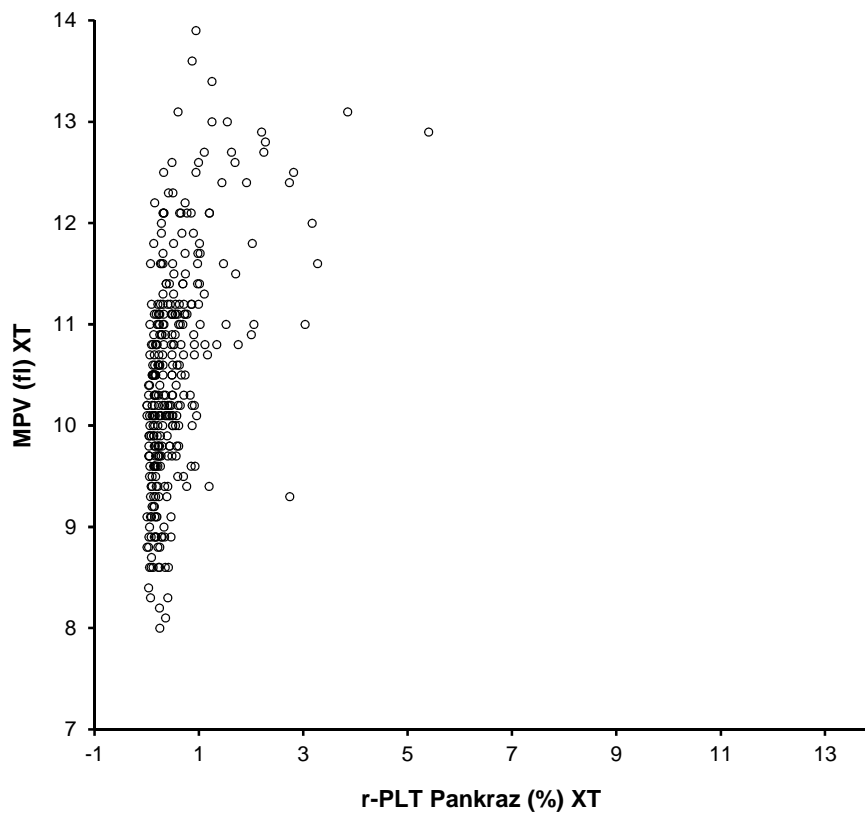
Date | 13 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,54
95% CI | 0,46 to 0,61 (normal approximation)

t statistic | 11,49
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

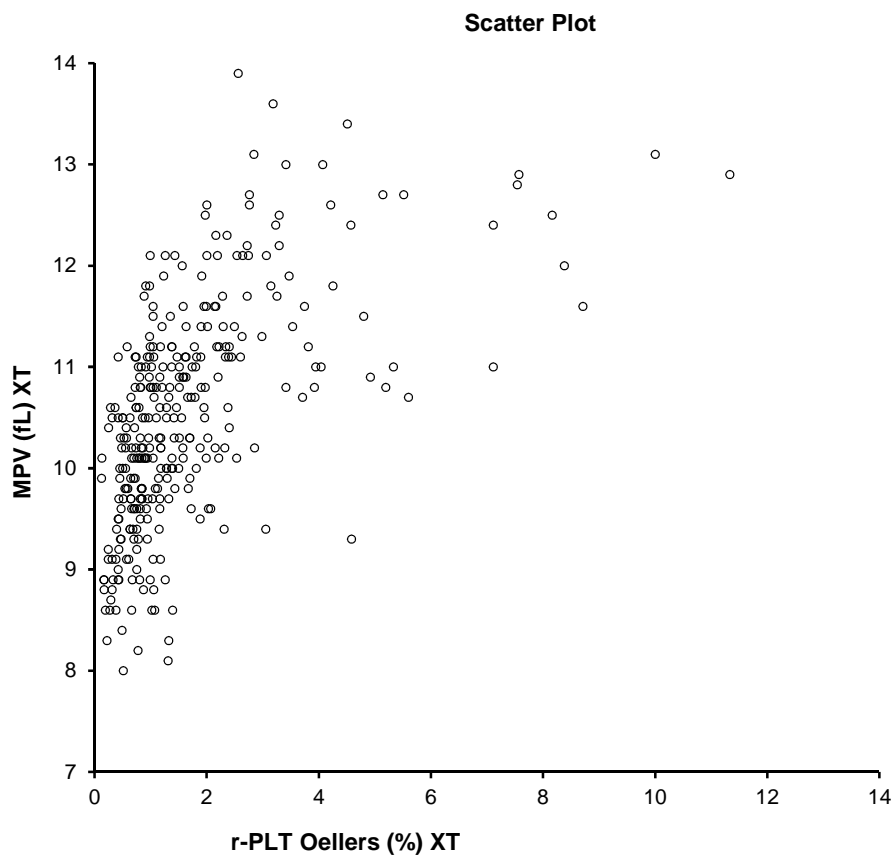
Performed by | r-PLT Oellers (%) XT v MPV (fL) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

Date | 13 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,65
95% CI | 0,58 to 0,71 (normal approximation)

t statistic | 15,13
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)



Spearman-Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern,
Sysmex XT-2000iV

- Vergleich der relativen **r-PLT-Werte der Gates nach Gelain et al., Pankraz et al. und Oellers et al. des XT-2000iV** mit dem Parameter **PCT (%)** (Thrombokrit) des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v PCT (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

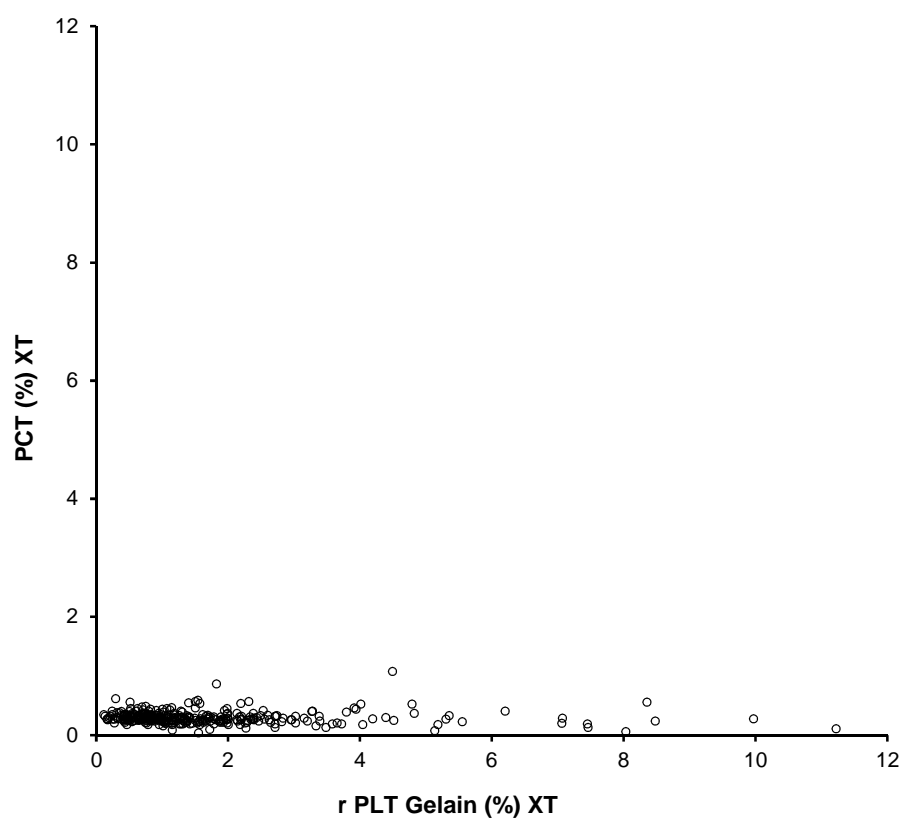
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | -0,20
95% CI | -0,30 to -0,09 (normal approximation)

t statistic | -3,62
DF | 318
2-tailed p | 0,0003 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v PCT (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

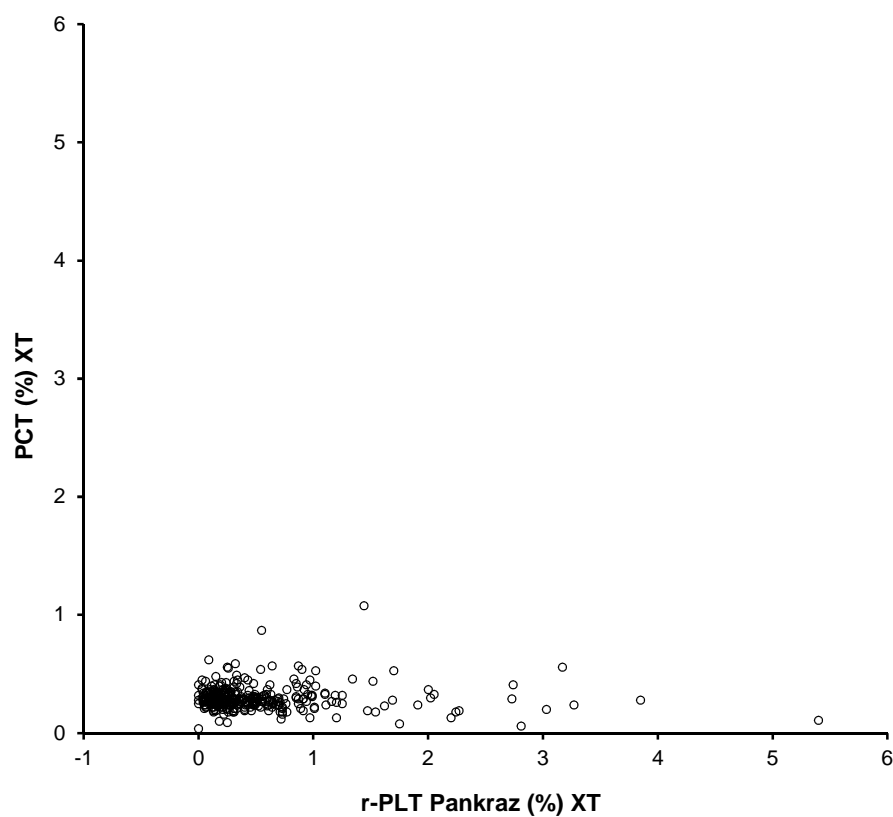
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | -0,08
95% CI | -0,19 to 0,03 (normal approximation)

t statistic | -1,45
DF | 318
2-tailed p | 0,1480 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Oellers (%) XT v PCT (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

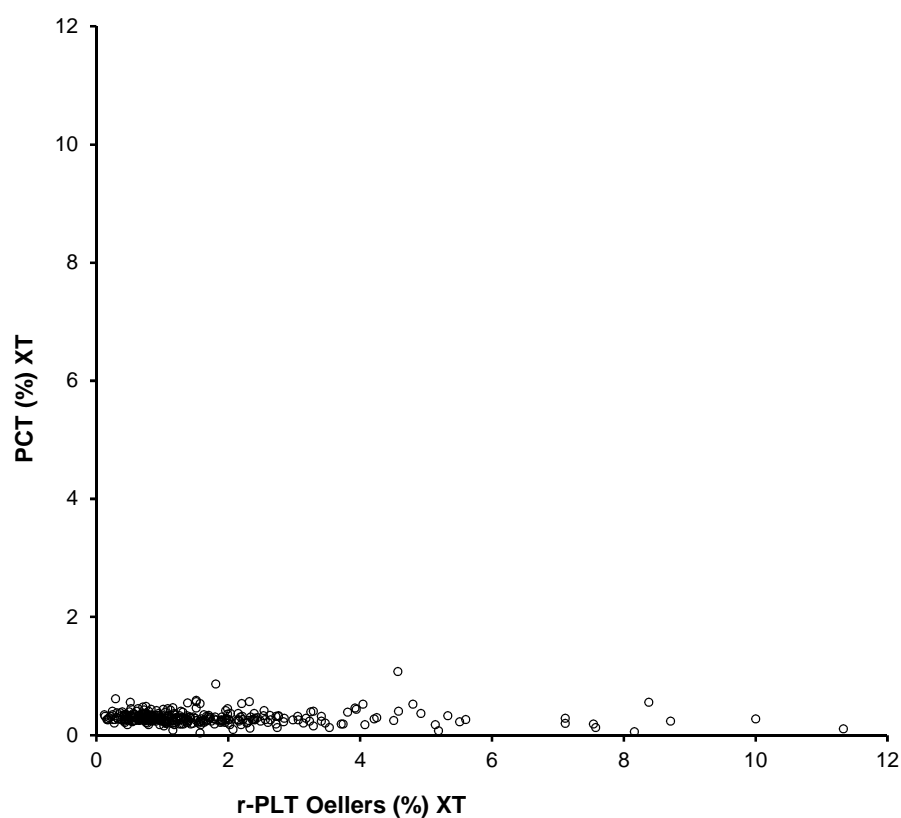
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | -0,20
95% CI | -0,30 to -0,09 (normal approximation)

t statistic | -3,67
DF | 318
2-tailed p | 0,0003 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Spearman-Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern,
Sysmex XT-2000iV

- Vergleich der relativen **r-PLT-Werte der Gates nach Gelain et al., Pankraz et al. und Oellers et al. des XT-2000iV** mit dem Parameter **P-LCR (%)** (Anteil großer Thrombozyten) des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v P-LCR (%) XT. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

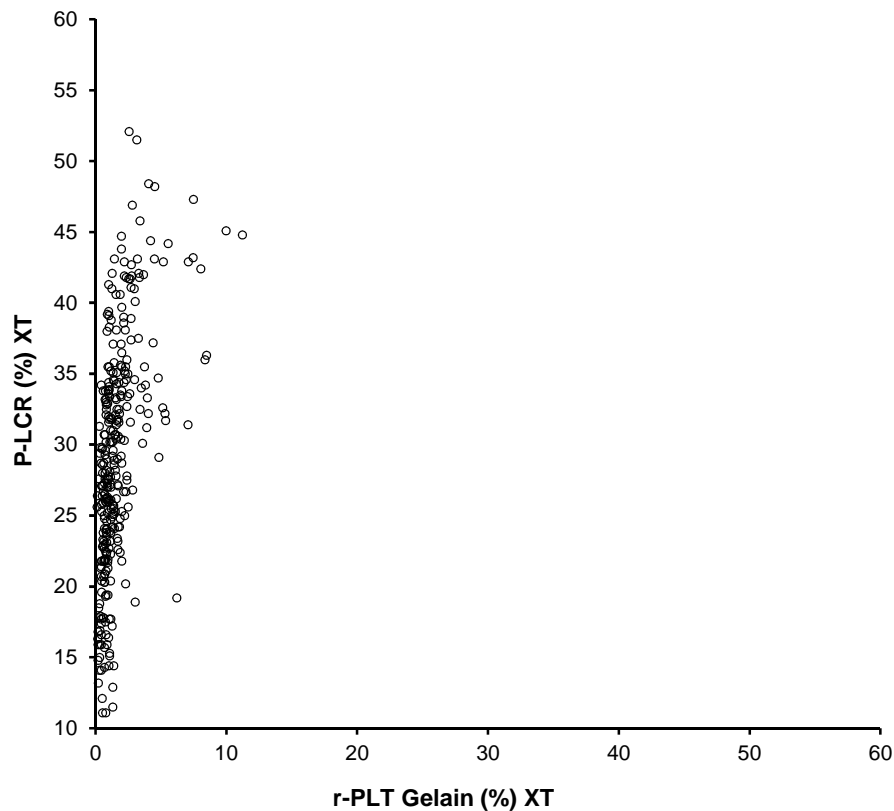
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,63
95% CI | 0,56 to 0,69 (normal approximation)

t statistic | 14,40
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v P-LCR (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

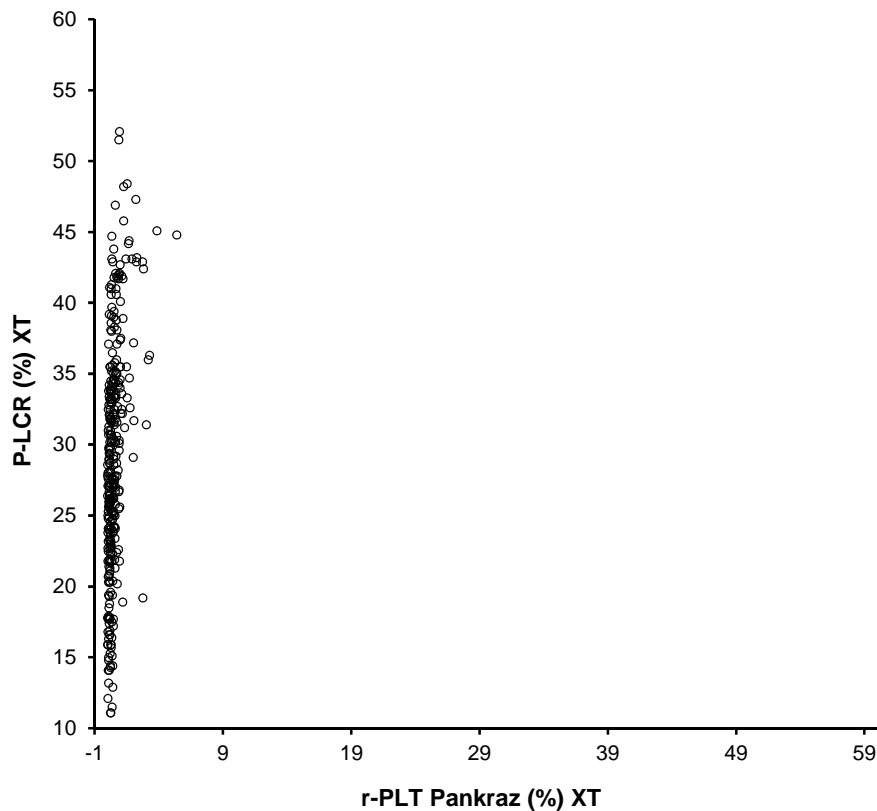
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,52
95% CI | 0,44 to 0,60 (normal approximation)

t statistic | 10,92
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Oellers (%) XT v P-LCR (%) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

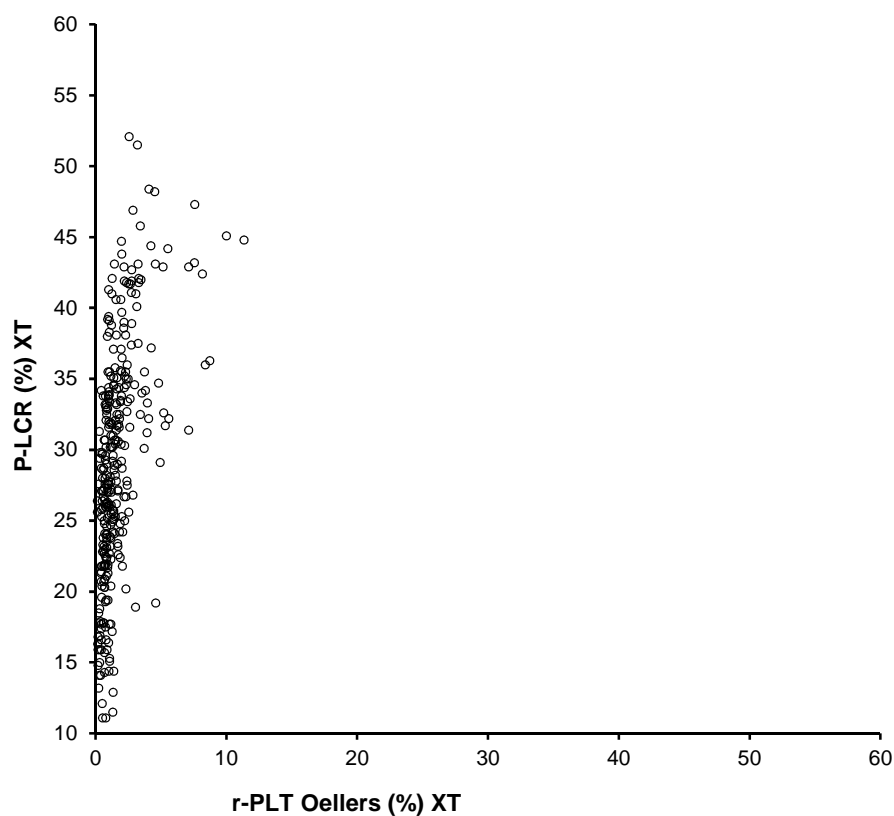
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,63
95% CI | 0,56 to 0,69 (normal approximation)

t statistic | 14,40
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Spearman-Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern,
Sysmex XT-2000iV

- Vergleich der relativen **r-PLT-Werte der Gates nach Gelain et al., Pankraz et al. und Oellers et al. des XT-2000iV** mit dem Parameter **PDW (fl)** (Verteilungsbreite des Thrombozytenvolumens) des XT-2000iV

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Gelain (%) XT v PDW (fl) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

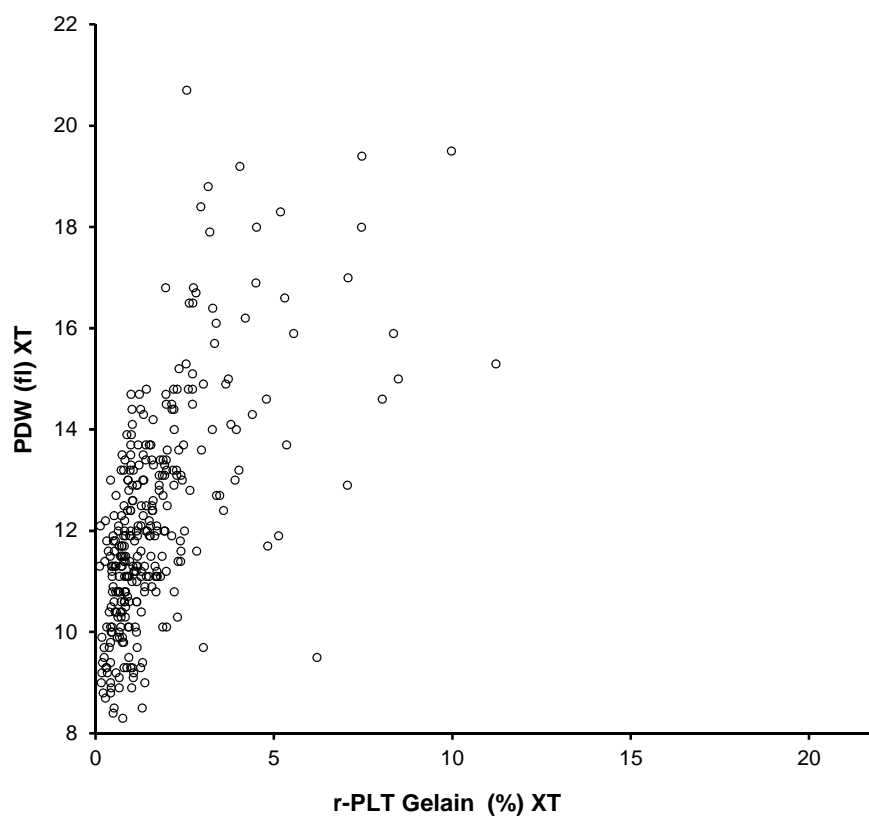
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,65
95% CI | 0,59 to 0,71 (normal approximation)

t statistic | 15,38
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Pankraz (%) XT v PDW (fl) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

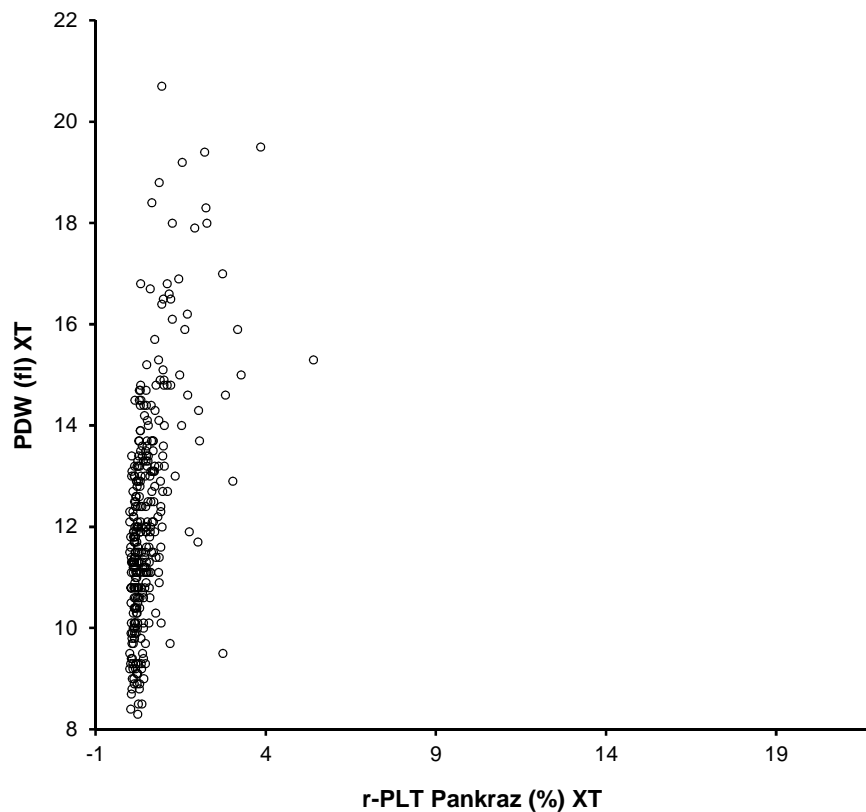
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,56
95% CI | 0,48 to 0,63 (normal approximation)

t statistic | 11,98
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT Oellers (%) XT v PDW (fL) XT. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

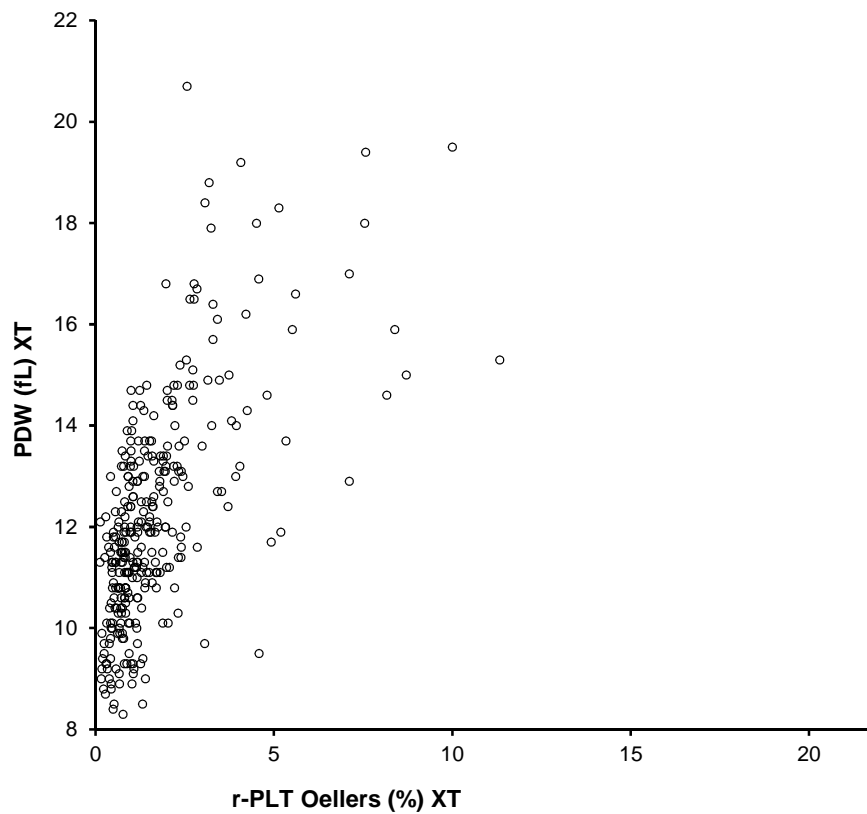
Date | 24 September 2013

n | 320 (cases excluded: 42 due to missing values)

rs statistic | 0,65
95% CI | 0,59 to 0,71 (normal approximation)

t statistic | 15,39
DF | 318
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Der Zusammenhang zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern

Spearman-Korrelation zwischen retikulierten Thrombozyten und Thrombozytenparametern, ADVIA 120/2120

- Vergleich der relativen **r-PLT-Werte des ADVIA 120/2120** mit den folgenden Thrombozytenindizes des ADVIA 120/2120:
 - **MPV (fl)** (mittleres Zellvolumen der Thrombozyten)
 - **PDW (%)** (Verteilungsbreite des Thrombozytenvolumens)
 - **PCT (%)** (Thrombokrit)
 - **MPC (g/dl)** (mittlere Konzentration innerer Thrombozytenbestandteile)
 - **PCDW (g/dl)** (Verteilungsbreite der MPC)
 - **MPM (pg)** (mittlere Thrombozytenmasse)
 - **PMDW (pg)** (Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse)
 - **Large PLTs ($10^9/l$)** (große Thrombozyten, > 20 fl)
 - **RBC Ghosts ($10^{12}/l$)** (Erythrozytenzellmembranen)
 - **RBC Fragments ($10^{12}/l$)** (Erythrozytenfragmente)
 - **% PLT Clumps** (prozentualer Anteil der Thrombozytenagglutinate)
 - **# PLT Clumps** (absoluter Anteil der Thrombozytenagglutinate)

Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v MPV (fl) ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

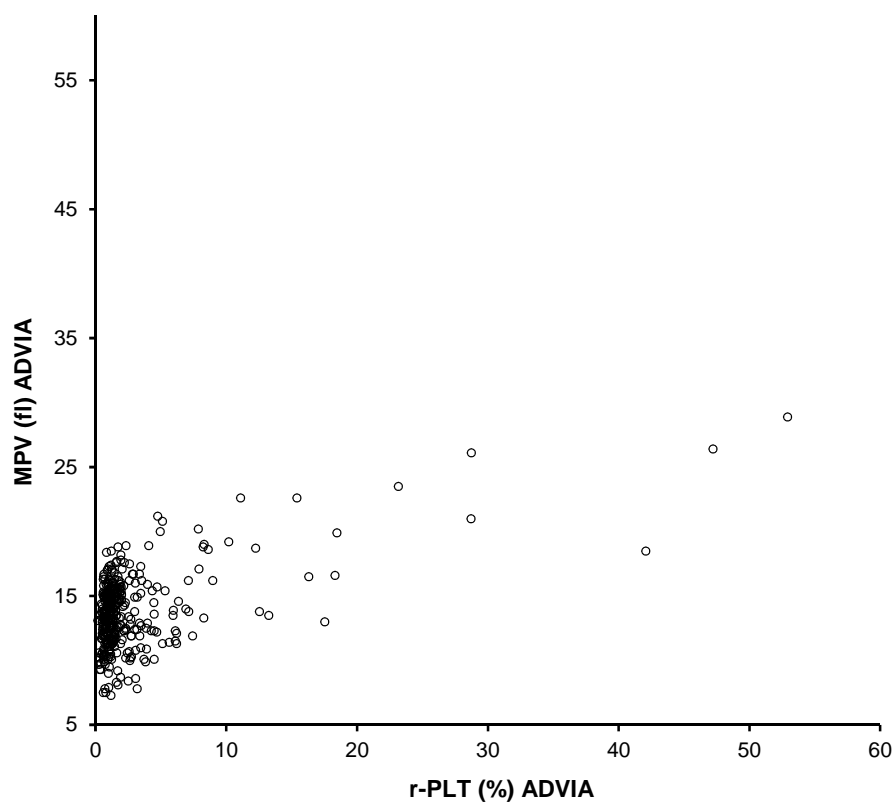
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,25
95% CI | 0,16 to 0,35 (normal approximation)

t statistic | 4,99
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v PDW (%) ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

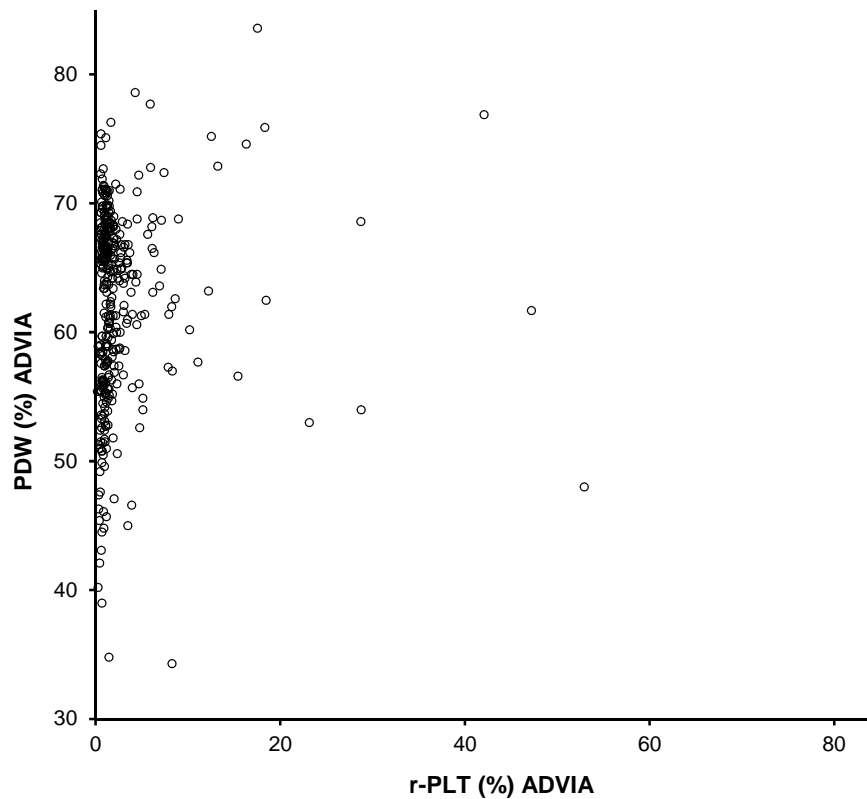
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,14
95% CI | 0,04 to 0,24 (normal approximation)

t statistic | 2,64
DF | 360
2-tailed p | 0,0088 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v PCT (%) ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

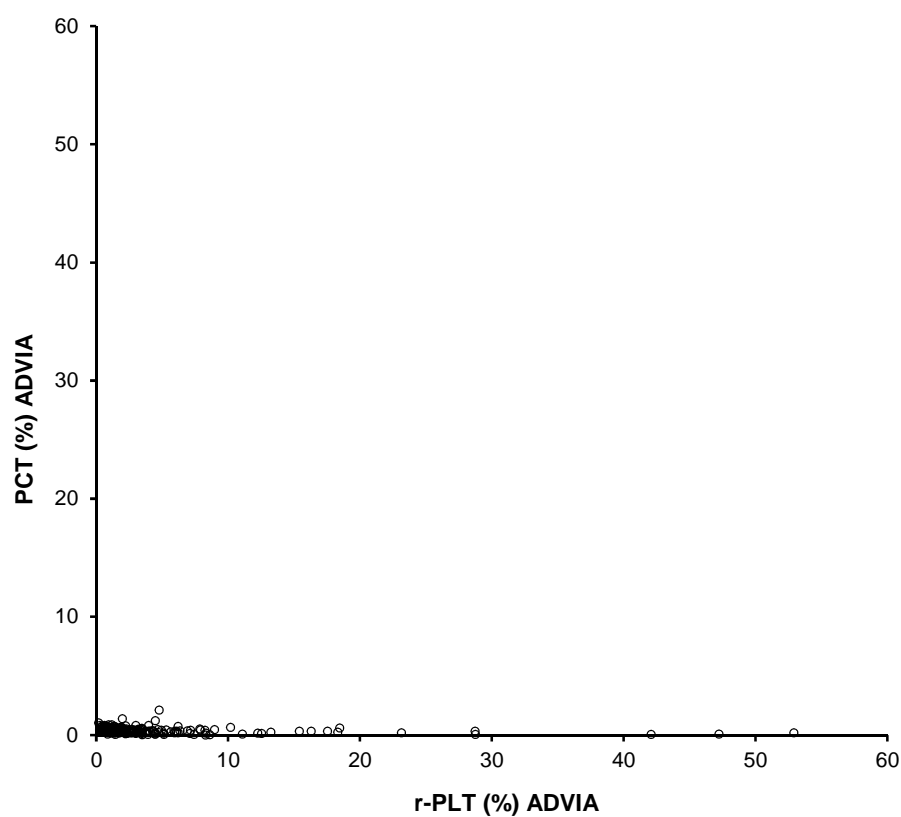
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | -0,42
95% CI | -0,50 to -0,33 (normal approximation)

t statistic | -8,73
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v MPC (g/dl) ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

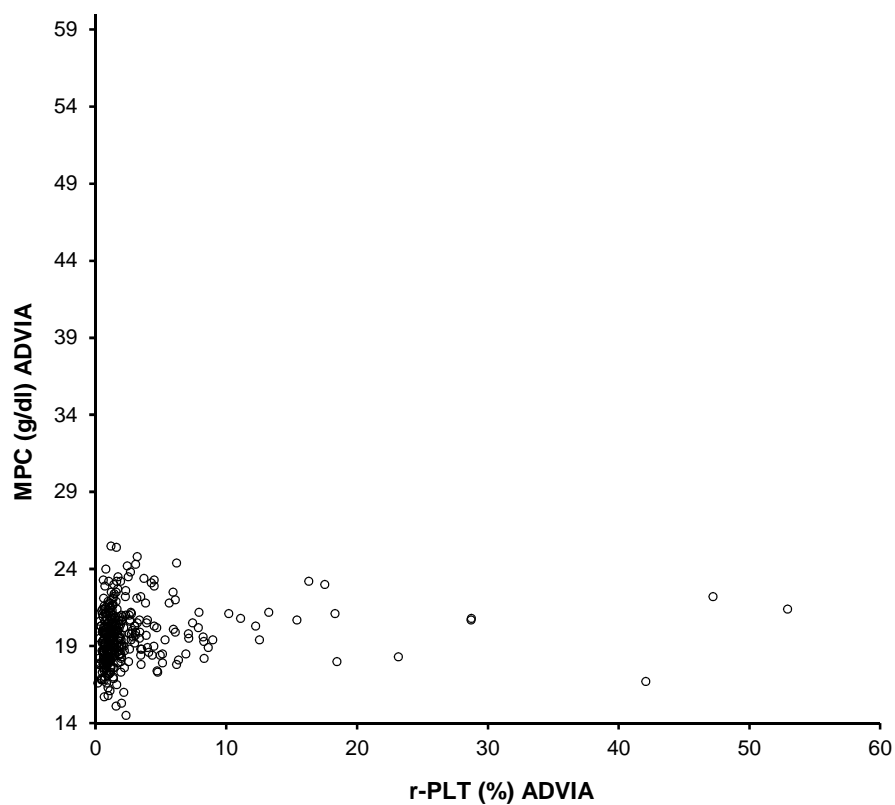
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,24
95% CI | 0,15 to 0,34 (normal approximation)

t statistic | 4,78
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

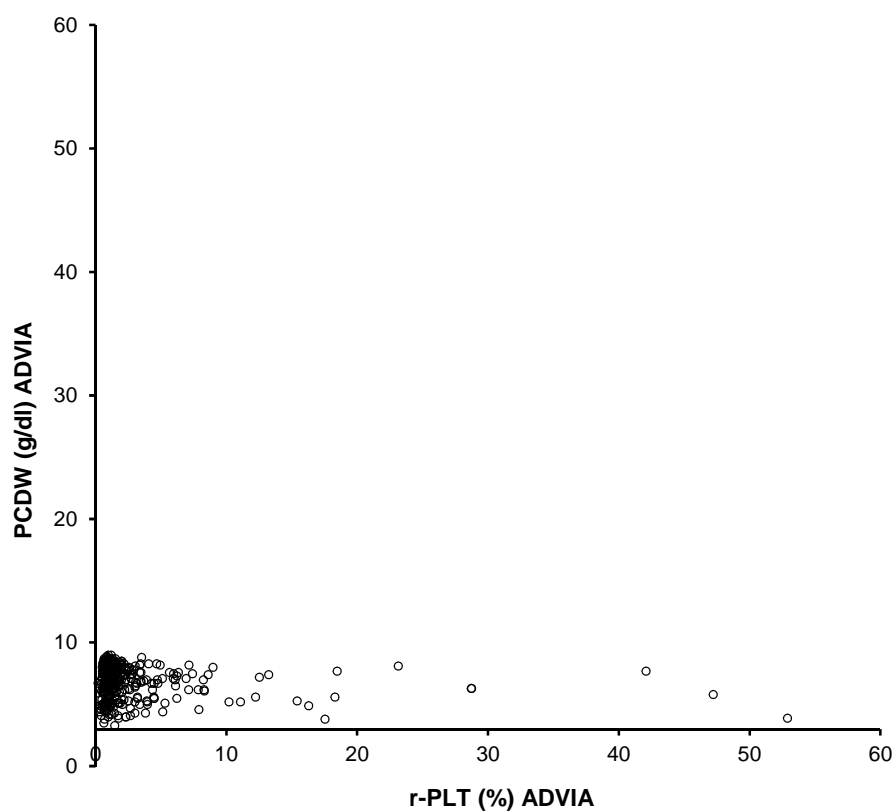
Performed by | r-PLT (%) ADVIA v PCDW (g/dl) ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic	-0,10	
95% CI	-0,20 to 0,01	(normal approximation)
t statistic	-1,84	
DF	360	
2-tailed p	0,0659	(t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v MPM (pg) ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

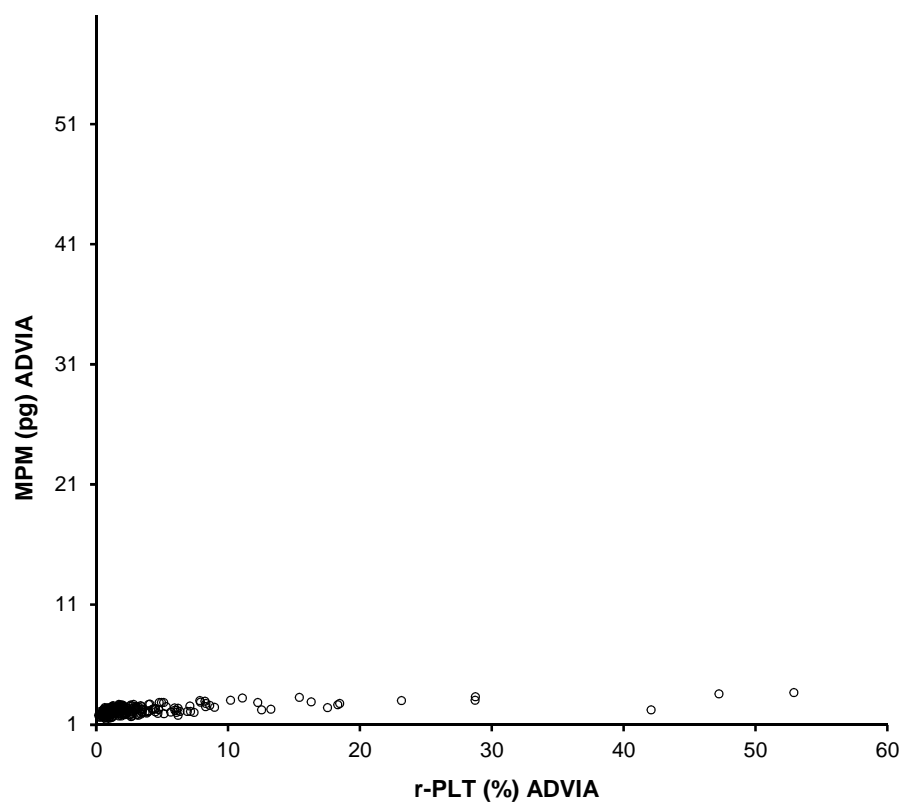
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,48
95% CI | 0,40 to 0,55 (normal approximation)

t statistic | 10,35
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v PMDW (pg) ADVIA. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

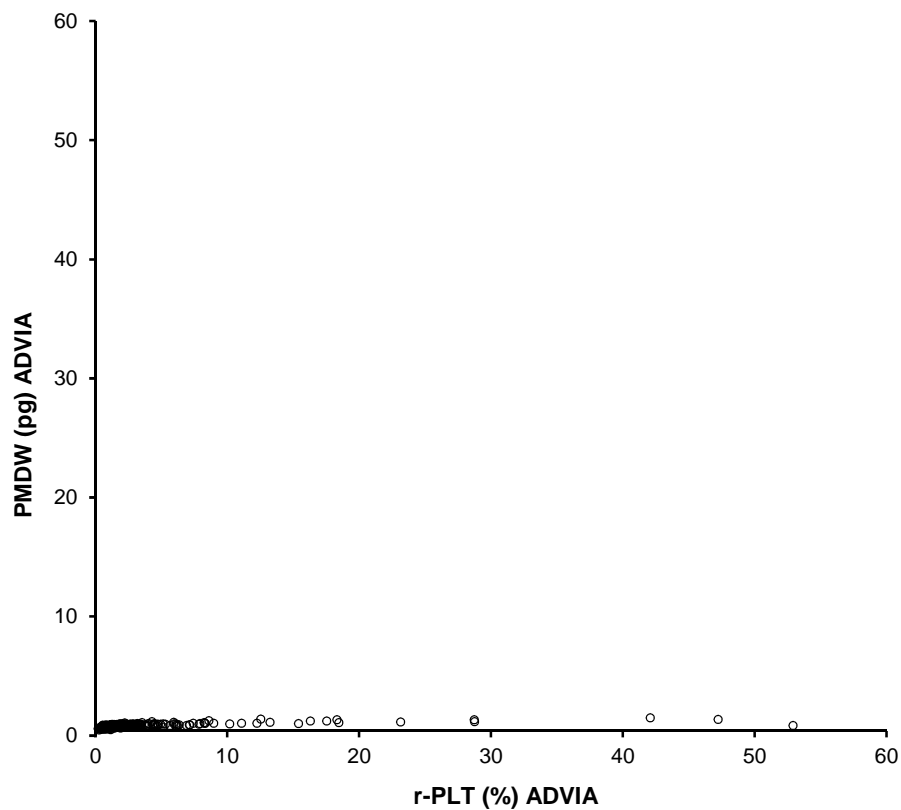
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,71
95% CI | 0,65 to 0,75 (normal approximation)

t statistic | 18,95
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v Large_PLT ($\times 10^9$ cells/L) ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

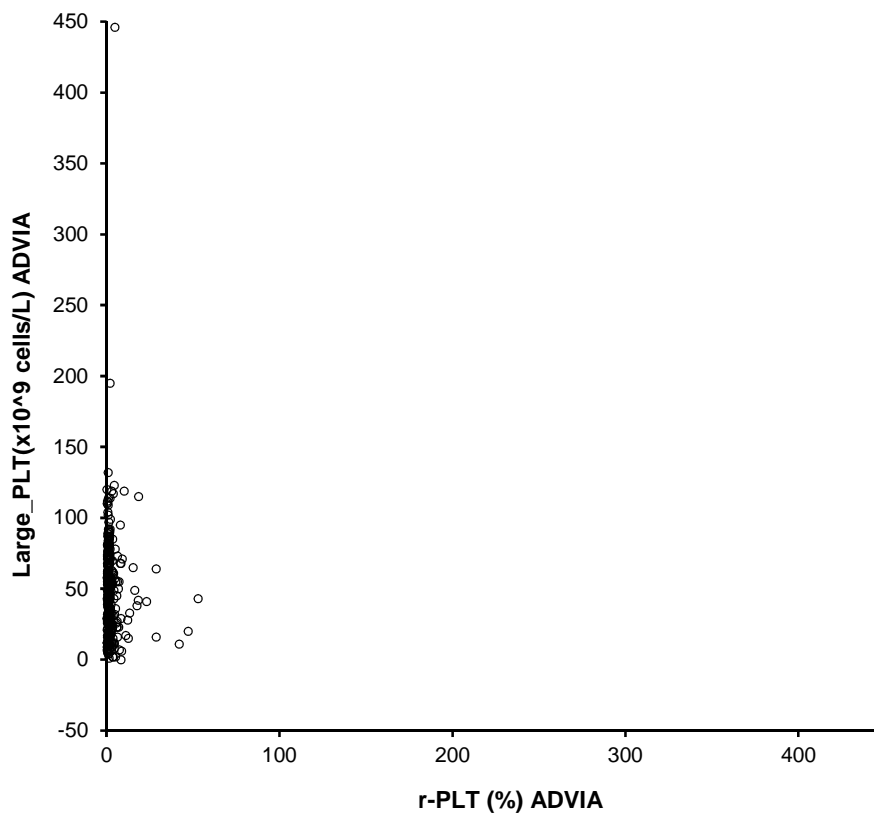
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | -0,13
95% CI | -0,23 to -0,03 (normal approximation)

t statistic | -2,57
DF | 360
2-tailed p | 0,0105 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v RBC_Ghosts (x10¹² cells/L) ADVIA. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

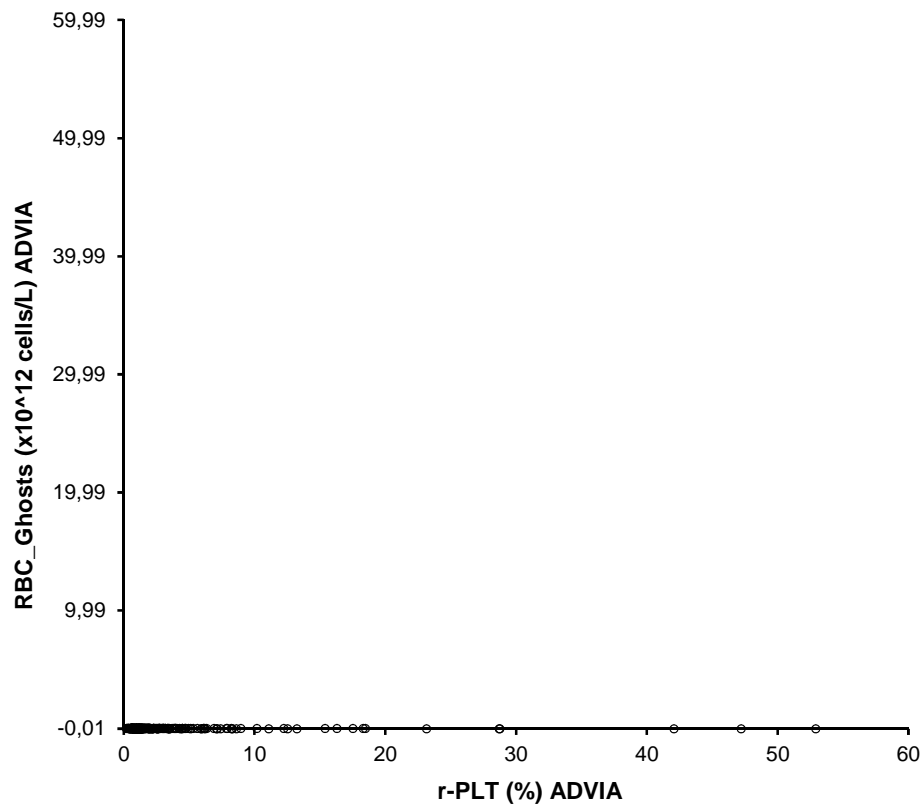
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | -0,22
95% CI | -0,32 to -0,12 (normal approximation)

t statistic | -4,35
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v RBC_Fragments (x10¹² cells/L) ADVIA. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

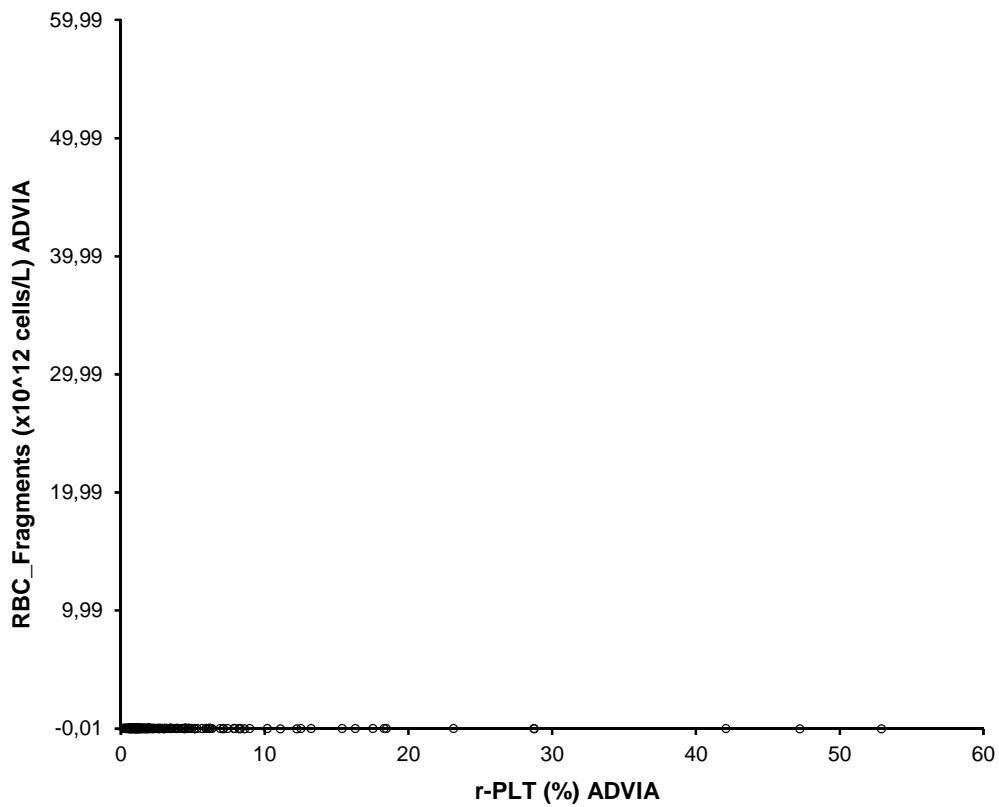
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | -0,35
95% CI | -0,43 to -0,25 (normal approximation)

t statistic | -6,98
DF | 360
2-tailed p | <0.0001 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v % Plt Clumps ADVIA. rs ≠ 0
Hochschulrechenzentrum

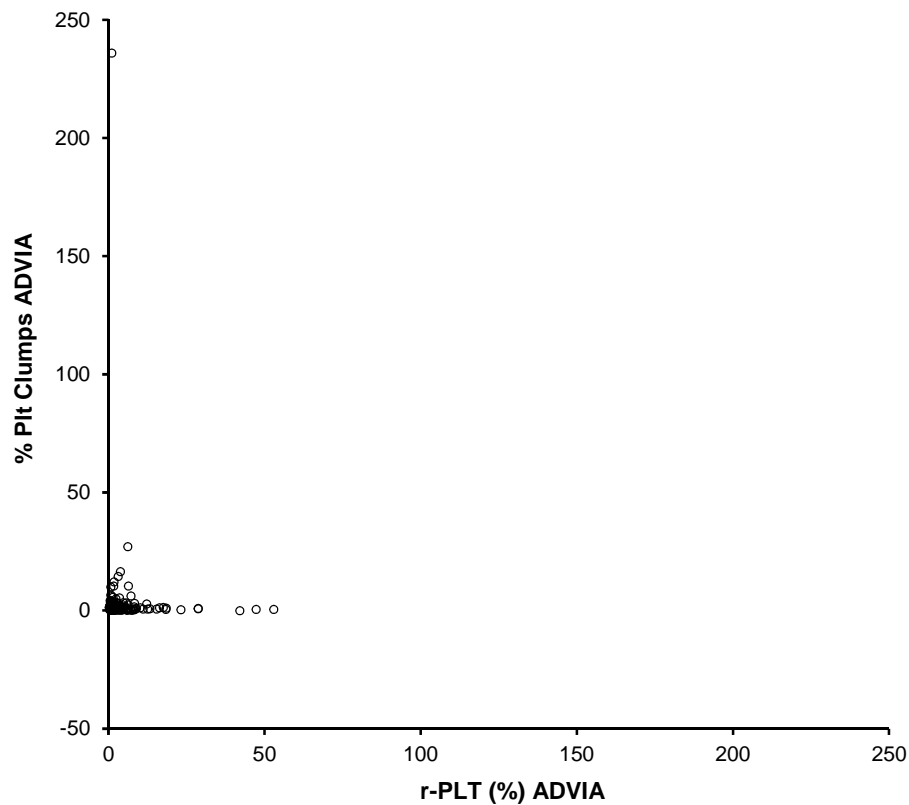
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | -0,03
95% CI | -0,13 to 0,07 (normal approximation)

t statistic | -0,57
DF | 360
2-tailed p | 0,5715 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot



Test | **Correlation - Spearman**

Performed by | r-PLT (%) ADVIA v # Plt Clumps ADVIA. rs \neq 0
Hochschulrechenzentrum

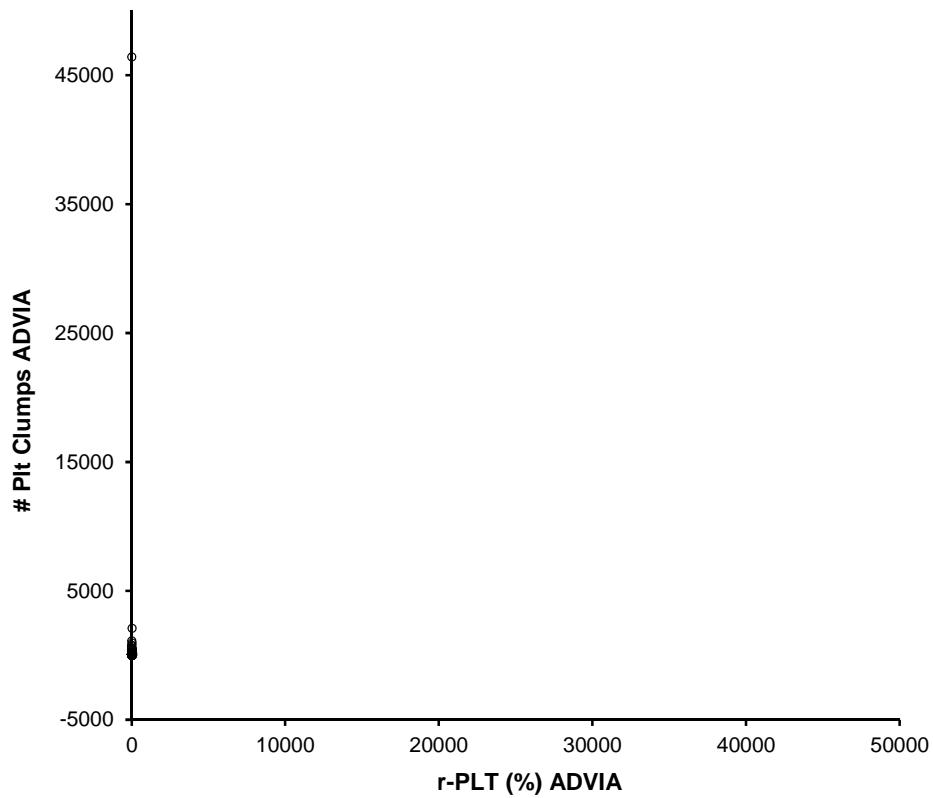
Date | 24 September 2013

n | 362

rs statistic | 0,11
95% CI | 0,01 to 0,21 (normal approximation)

t statistic | 2,14
DF | 360
2-tailed p | 0,0331 (t approximation, corrected for ties)

Scatter Plot

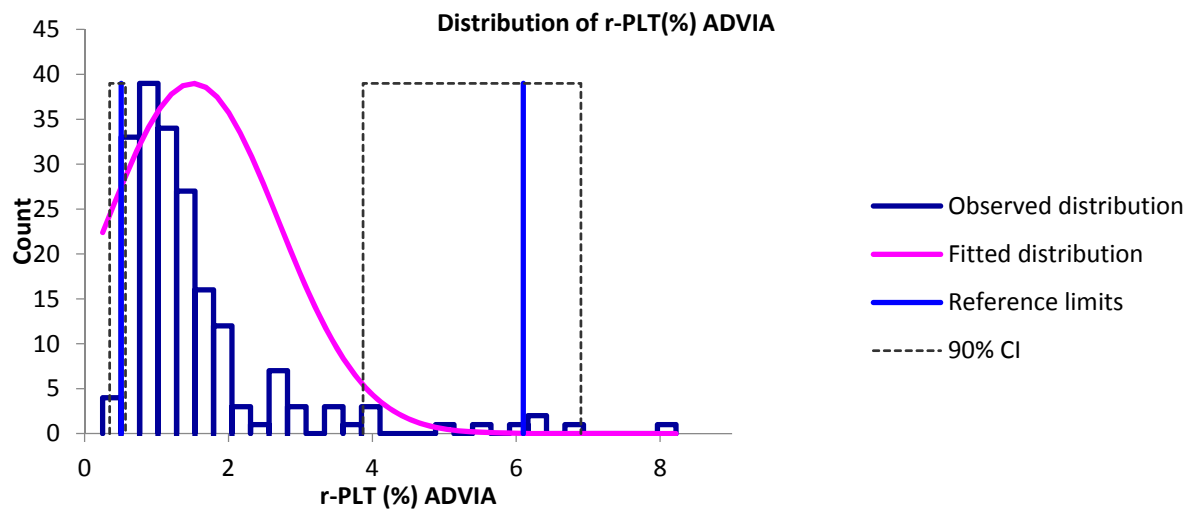


Referenzintervalle

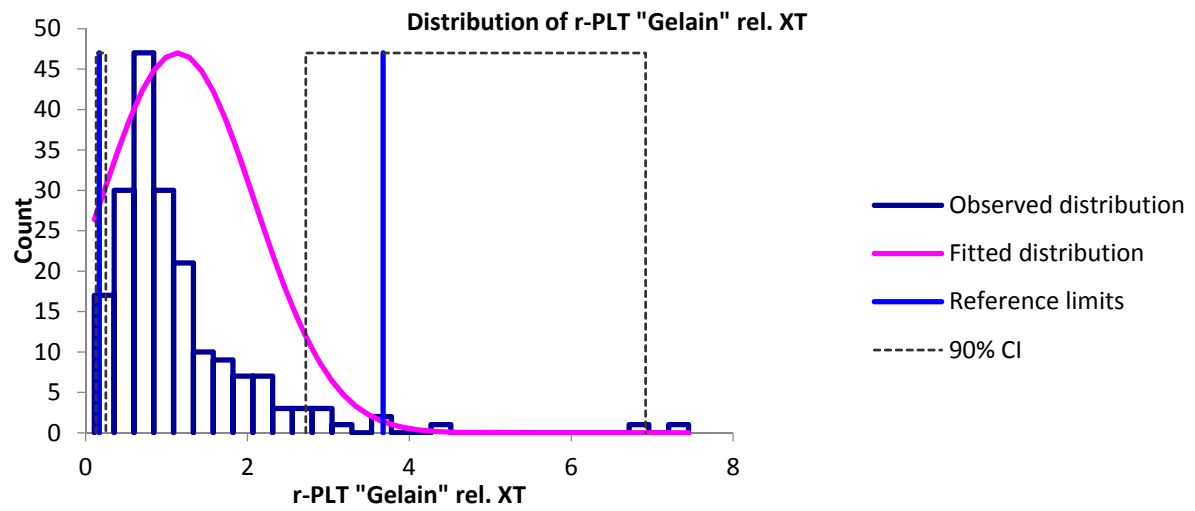
Histogramme der Verteilung

- Alle Hunde (n = 193), retikulierte Thrombozyten

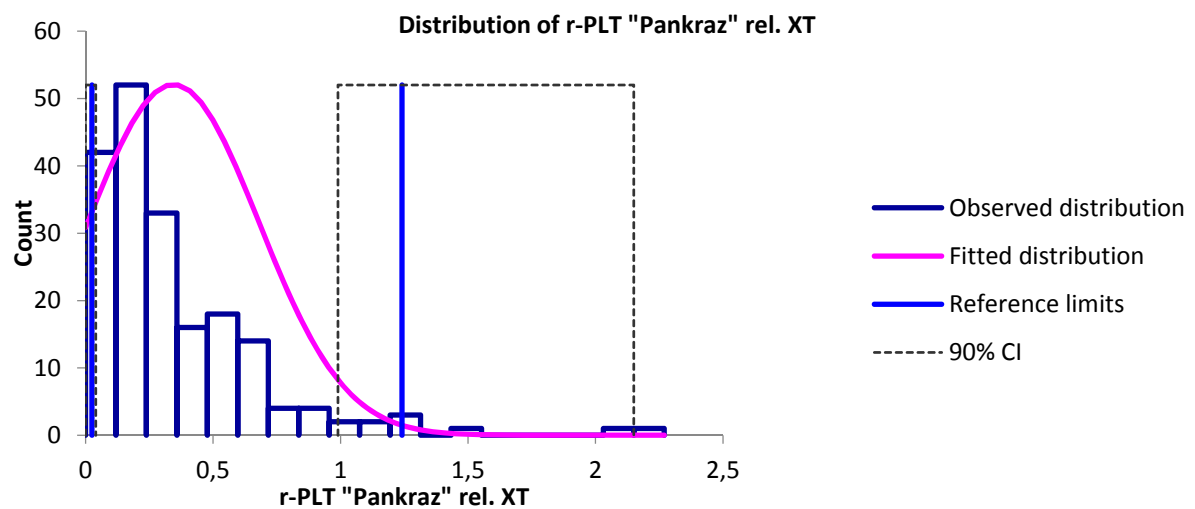
- r-PLT (%) ADVIA 120/2120



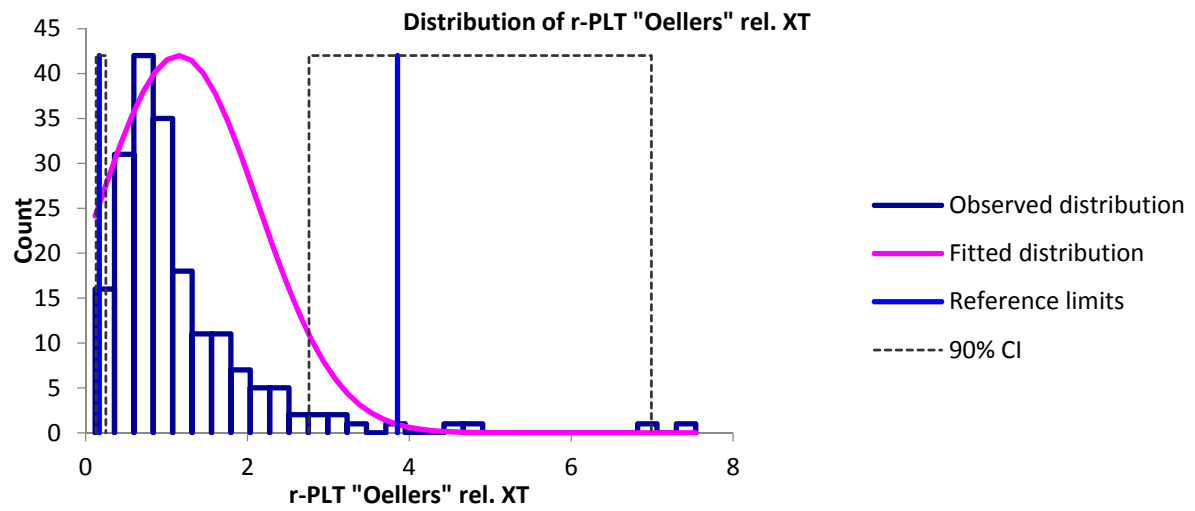
- r-PLT (%) „Gelain“ XT-2000iV



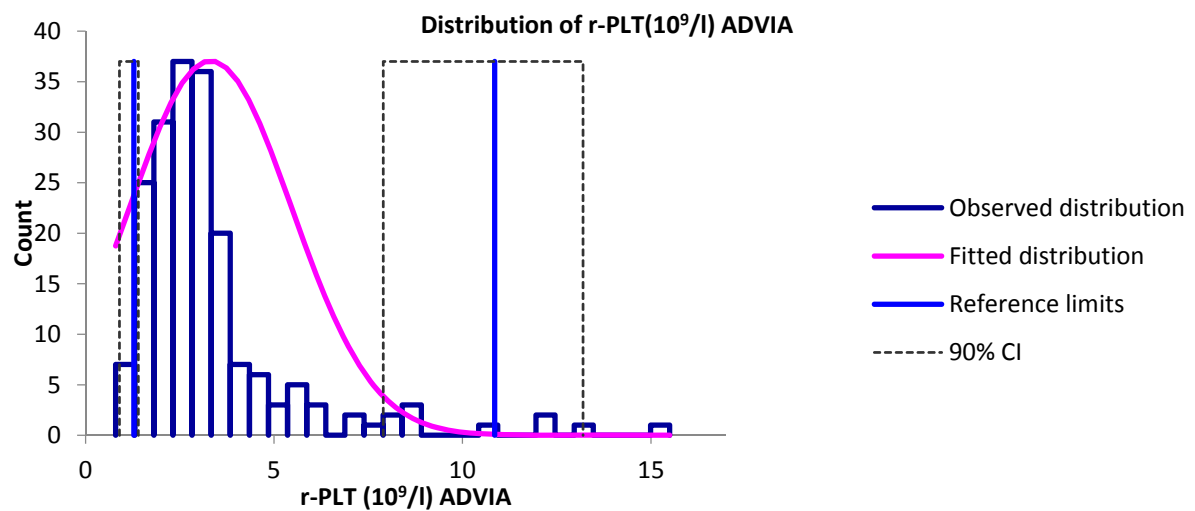
- r-PLT (%) „Pankraz“ XT-2000iV



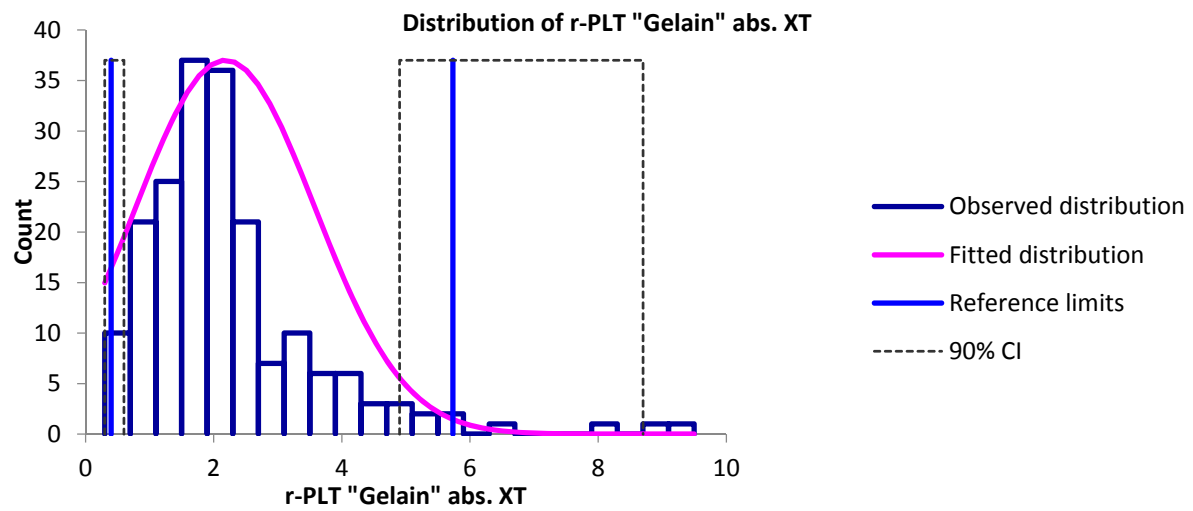
- r-PLT (%) „Oellers“ XT-2000iV



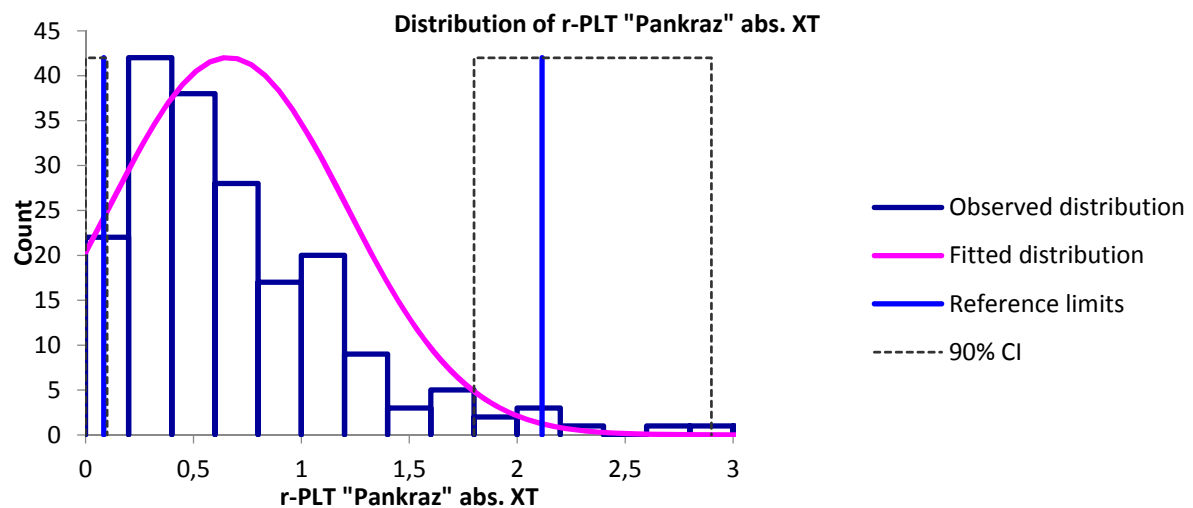
- r-PLT ($10^9/l$) ADVIA 120/2120



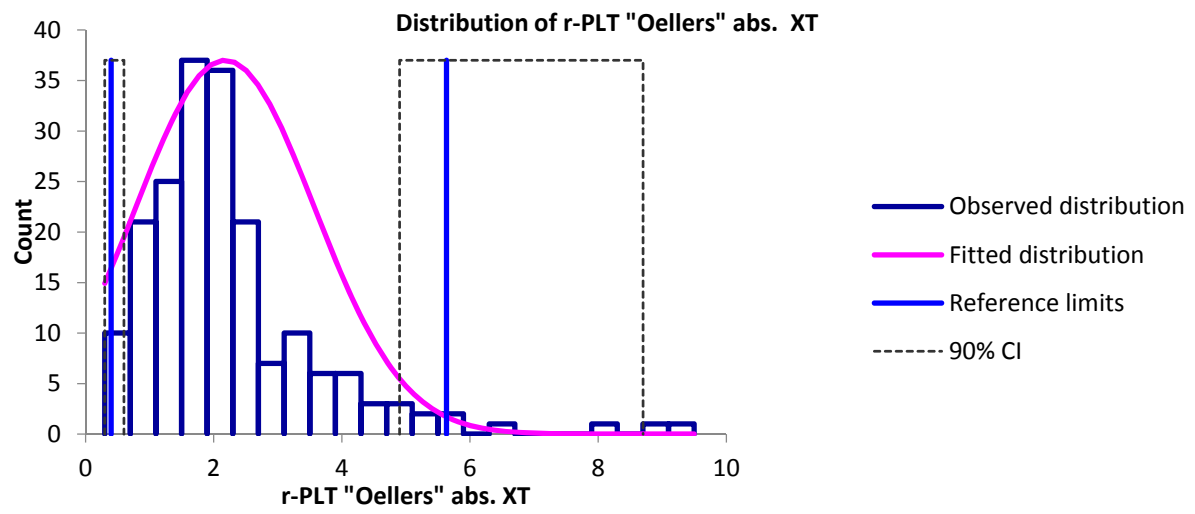
- r-PLT ($10^9/l$) „Gelain“ XT-2000iV



- r-PLT ($10^9/l$) „Pankraz“ XT-2000iV

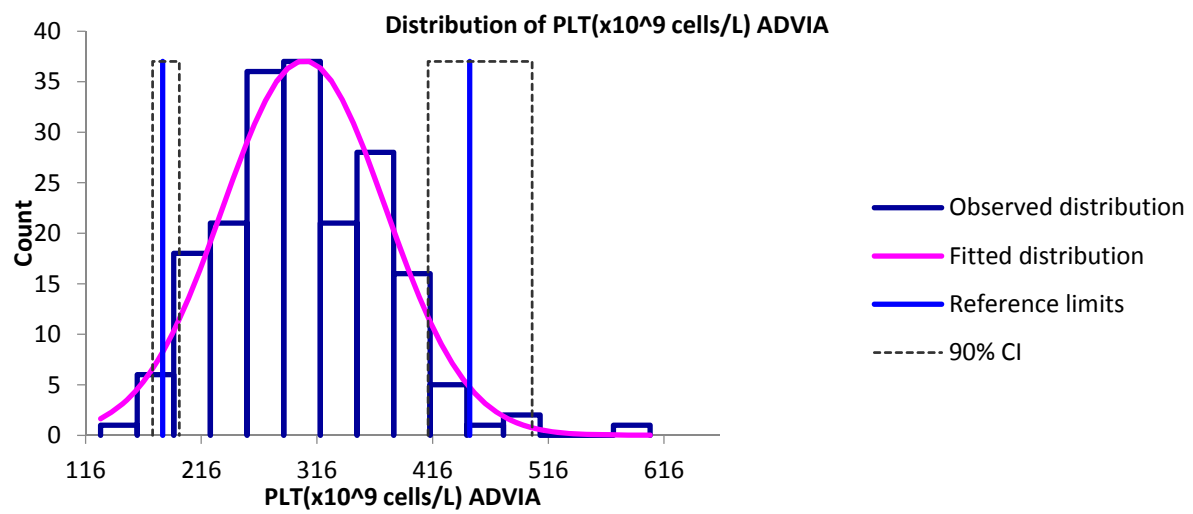


- r-PLT ($10^9/l$) „Oellers“ XT-2000iV

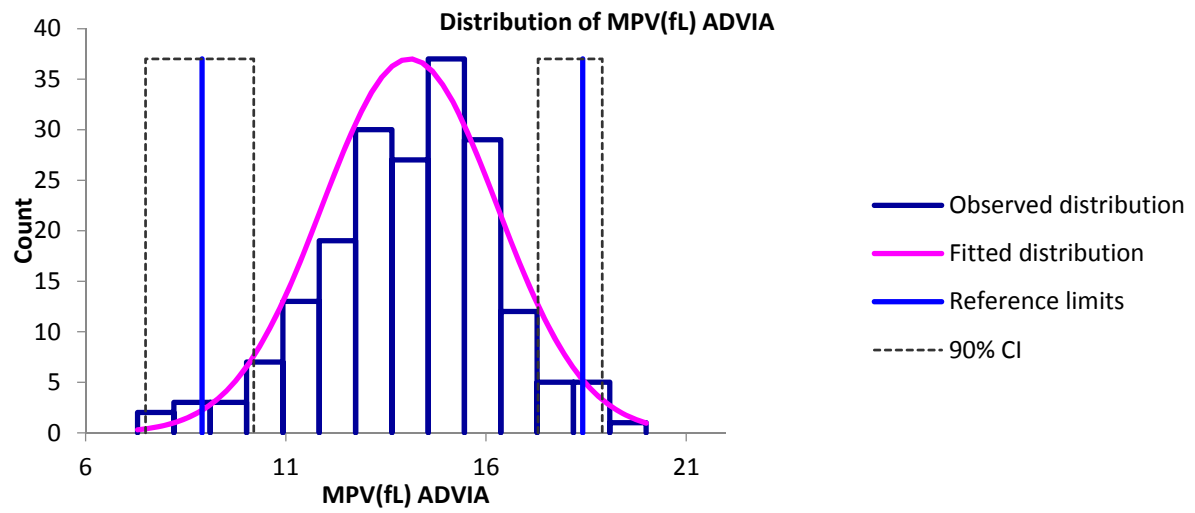


- Alle Hunde (n = 193), Thrombozytenindizes ADVIA 120/2120

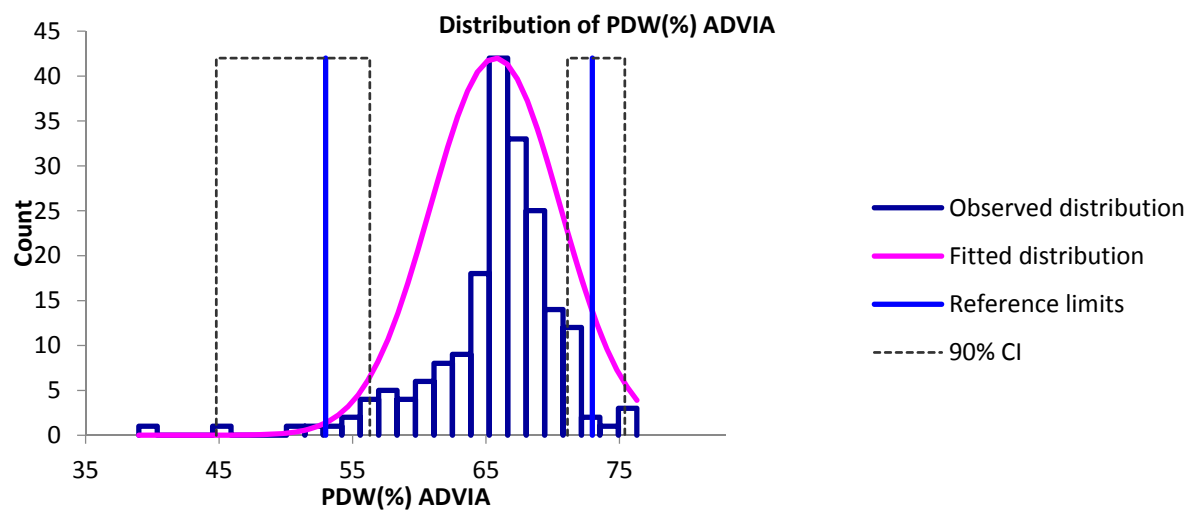
- PLT ($10^9/l$) ADVIA 120/2120



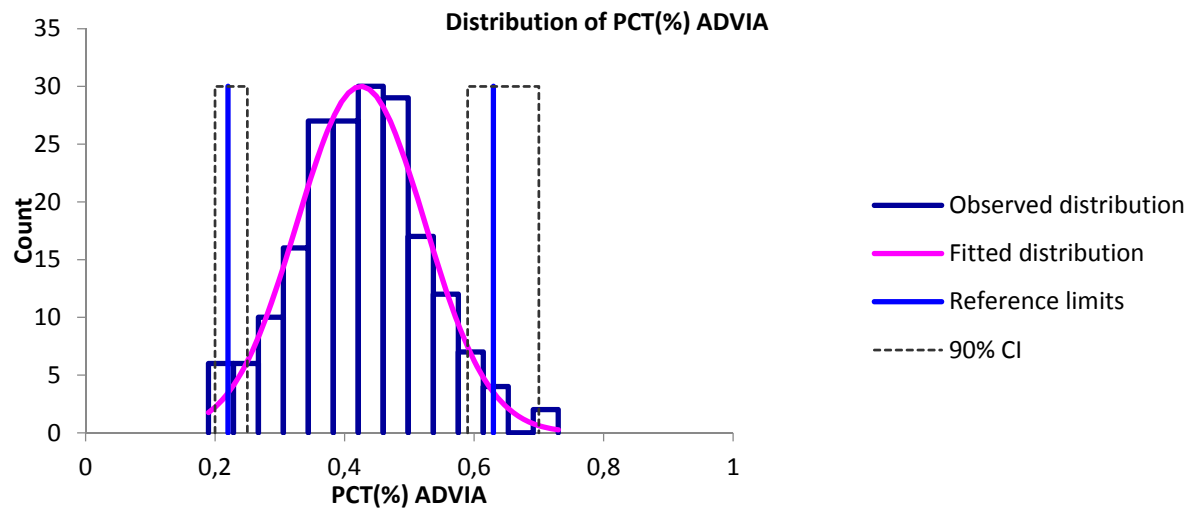
- MPV (fl) ADVIA 120/2120



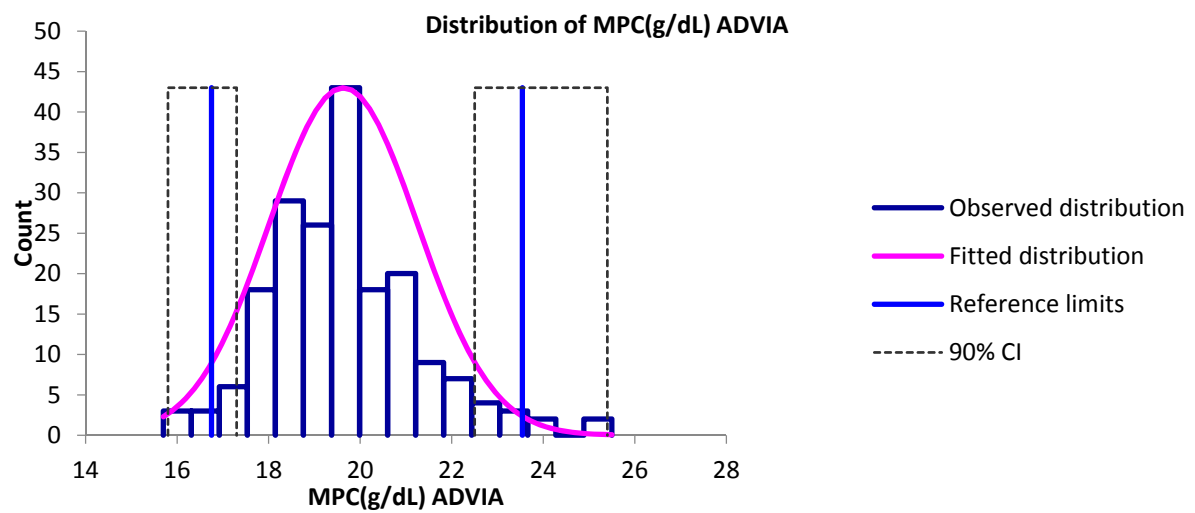
- PDW (%) ADVIA 120/2120



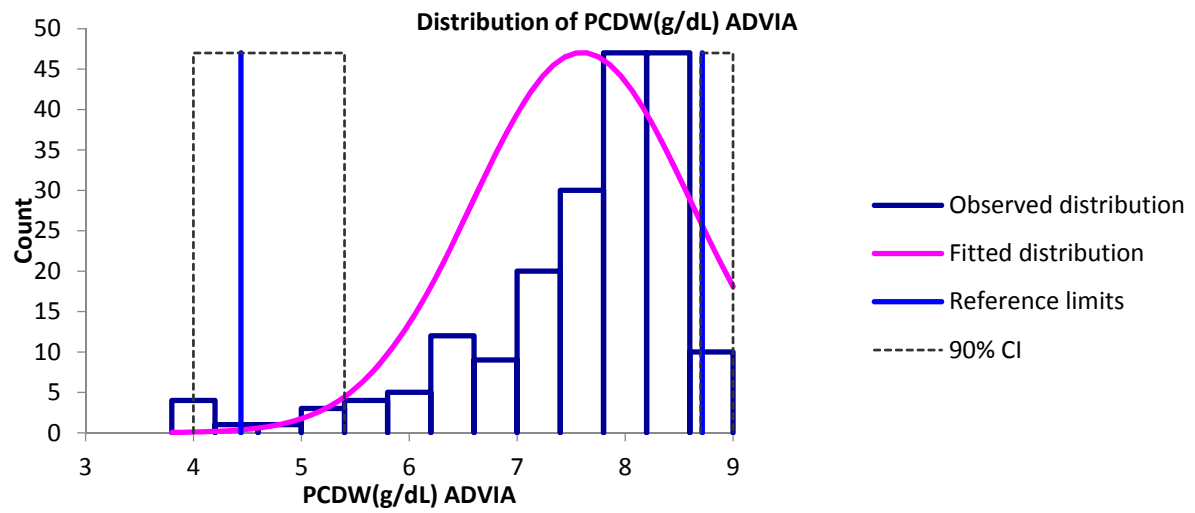
- PCT (%) ADVIA 120/2120



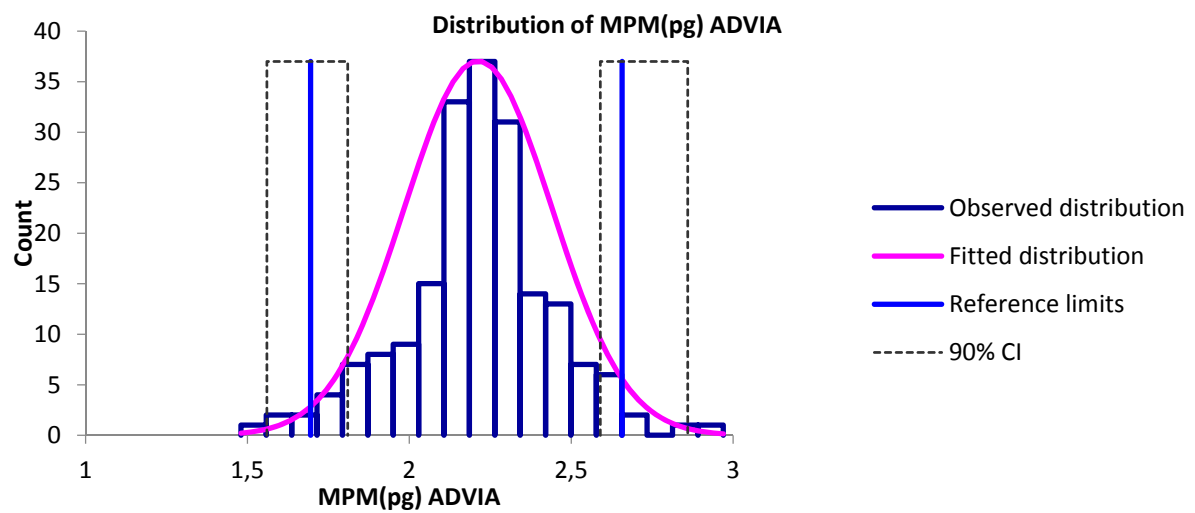
- MPC (g/dl) ADVIA 120/2120



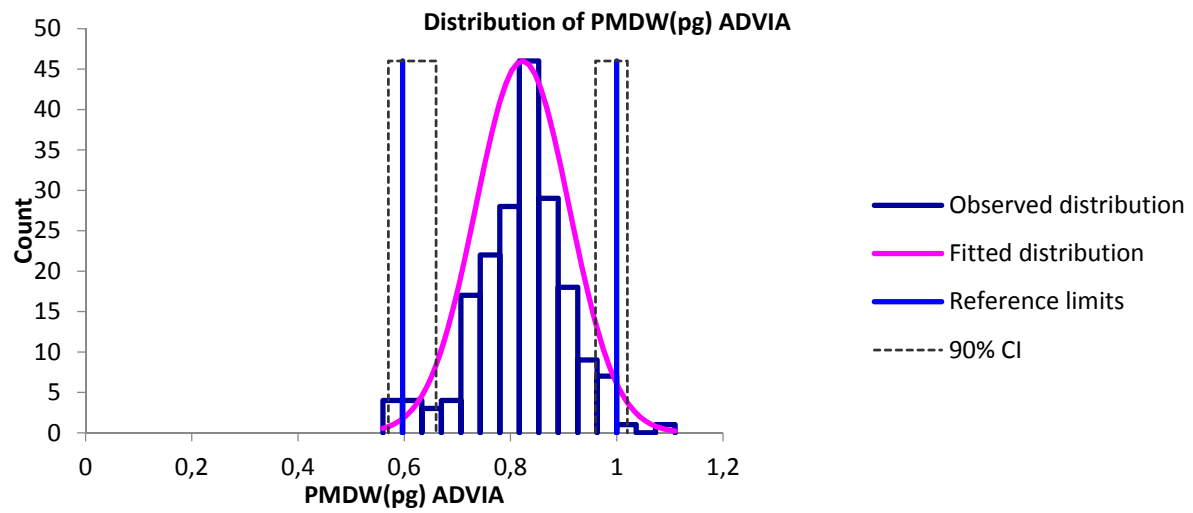
- PCDW (g/dl) ADVIA 120/2120



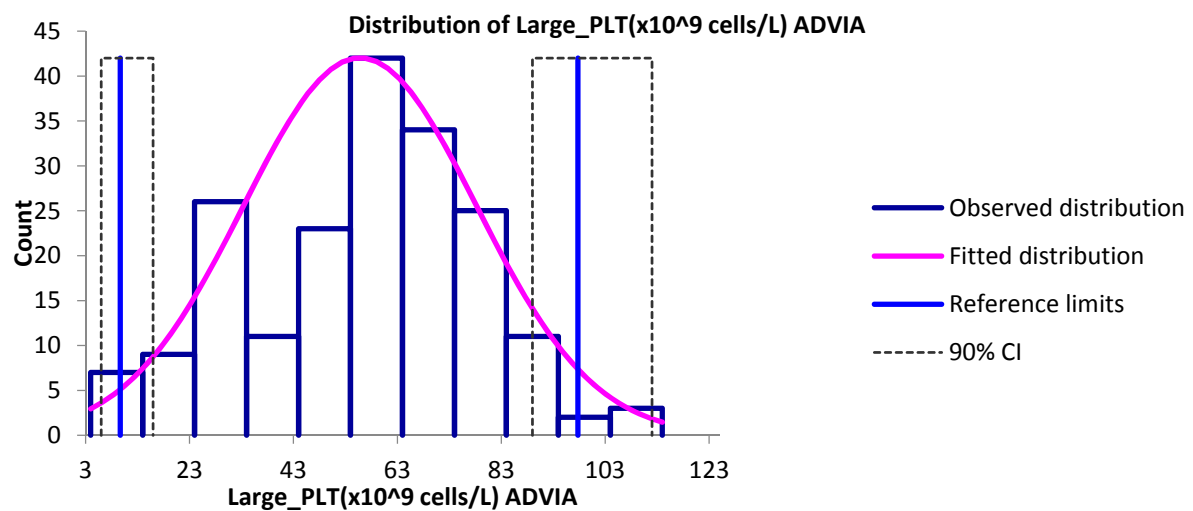
- MPM (pg) ADVIA 120/2120



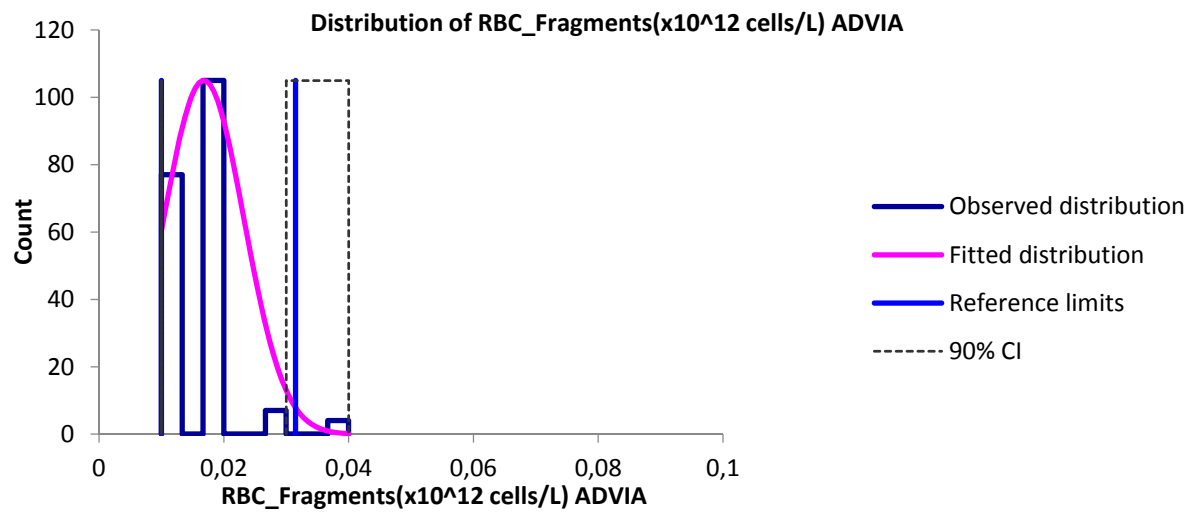
- PMDW (pg) ADVIA 120/2120



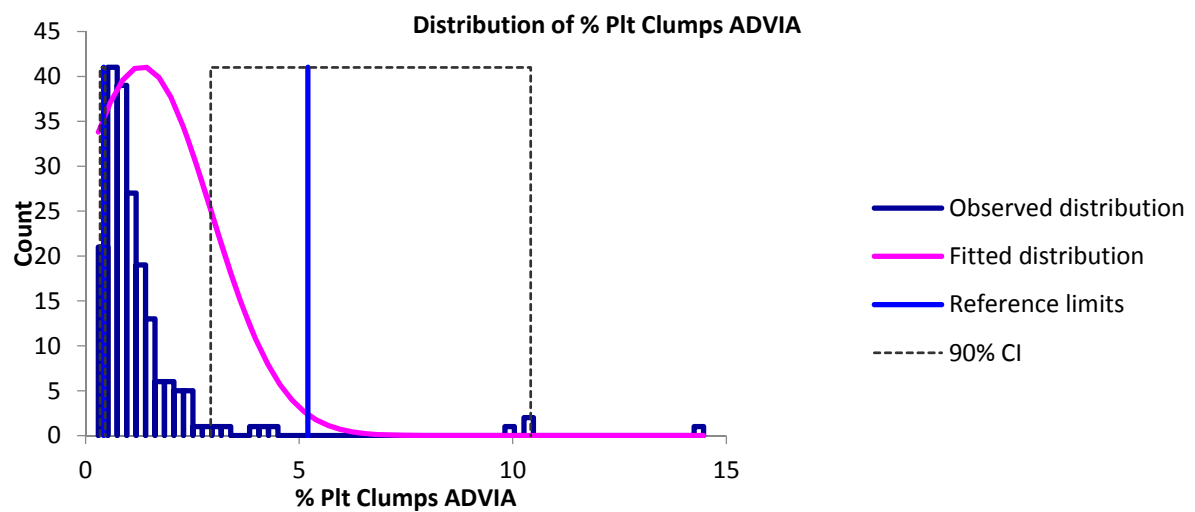
- Large PLT ($\times 10^9/l$) ADVIA 120/2120



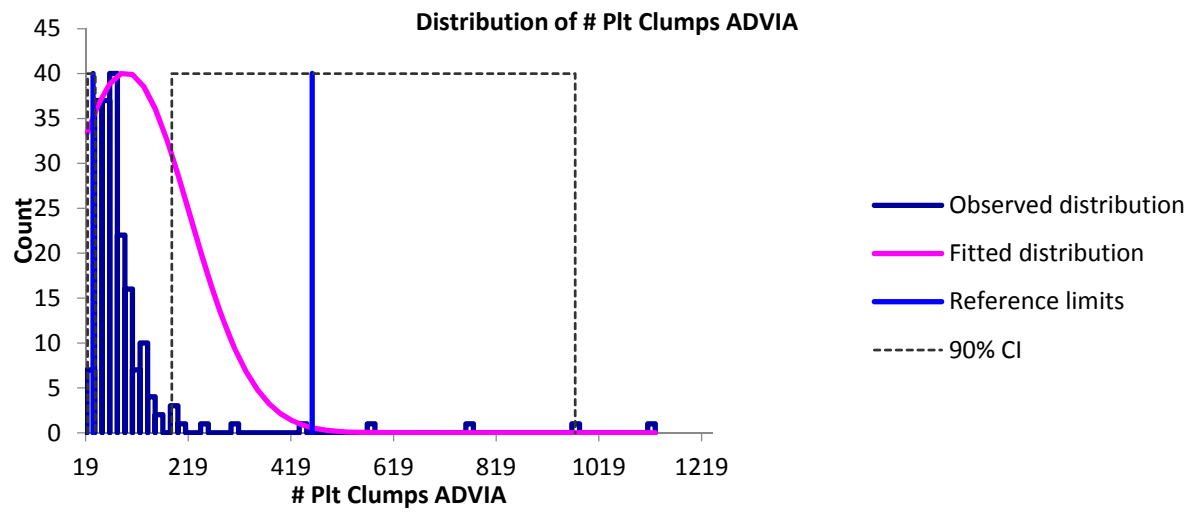
- RBC Fragments ($10^{12}/l$) ADVIA 120/2120



- % Plt Clumps ADVIA 120/2120

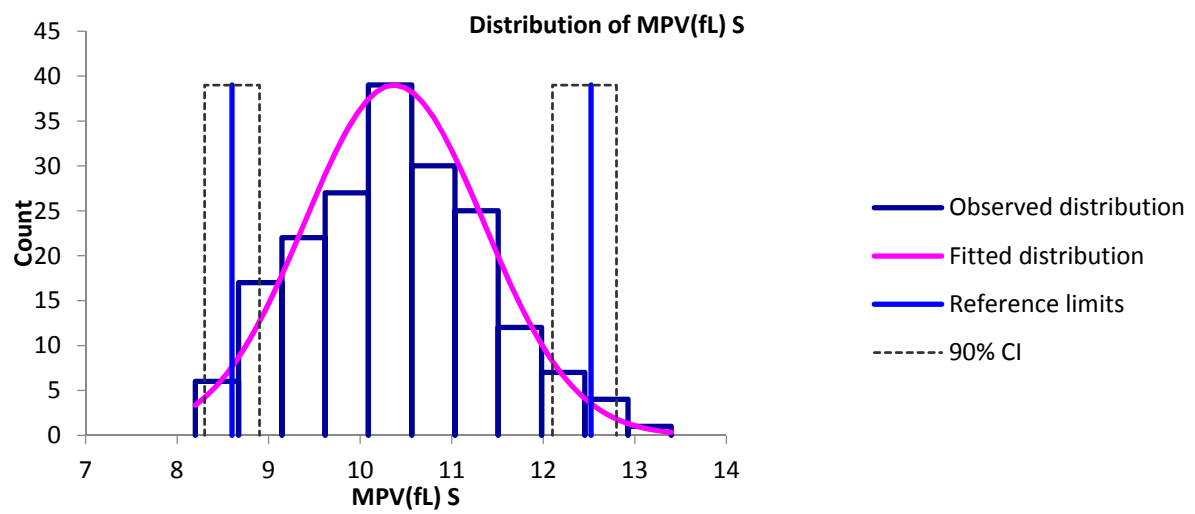


- # Plt Clumps (number events) ADVIA 120/2120

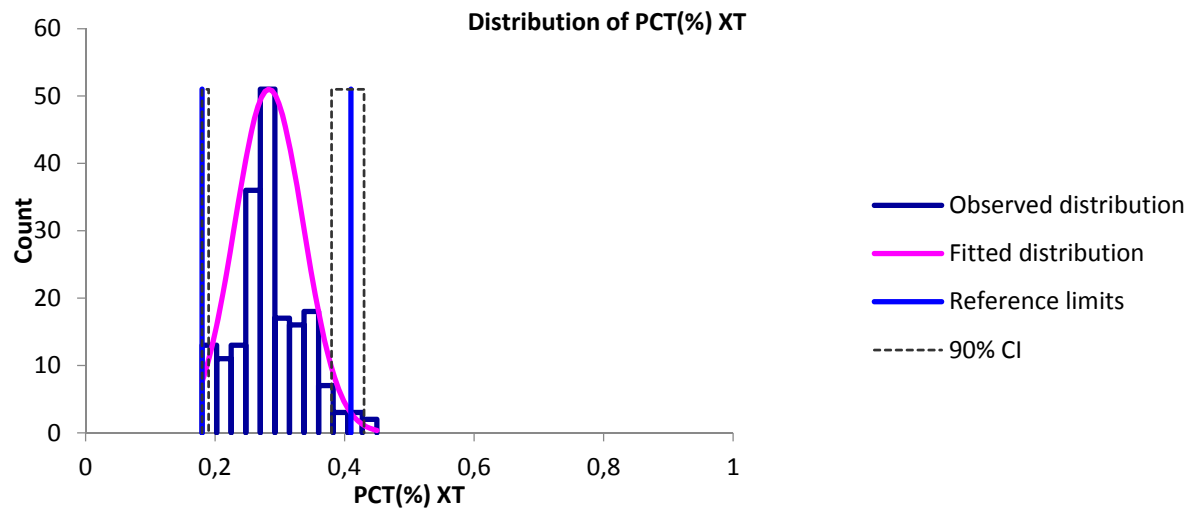


- Alle Hunde (n = 193), Thrombozytenindizes XT-2000iV

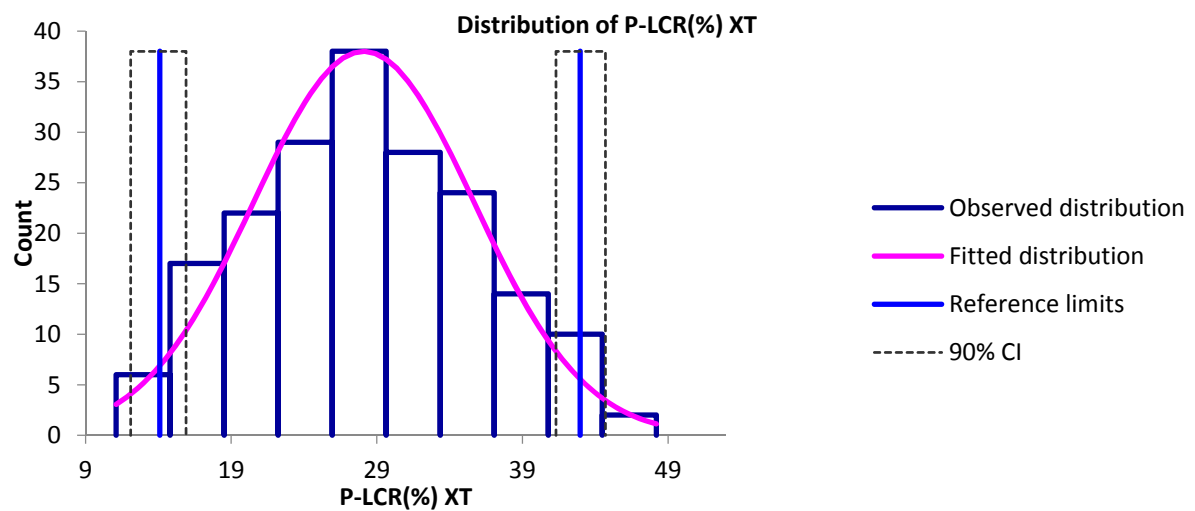
- MPV (fl) XT-2000iV, n=190



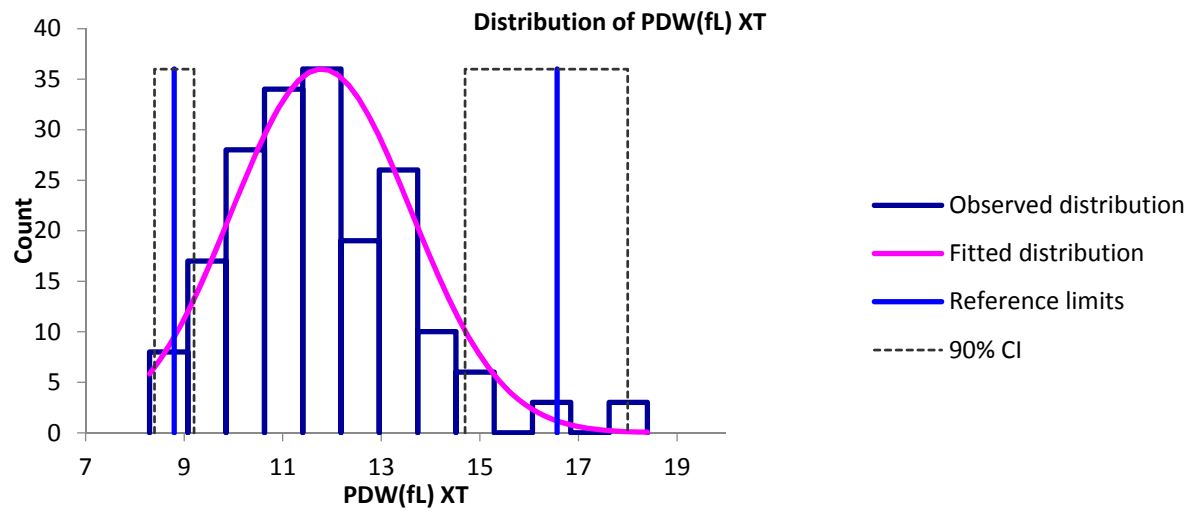
- PCT (%) XT-2000iV, n=190



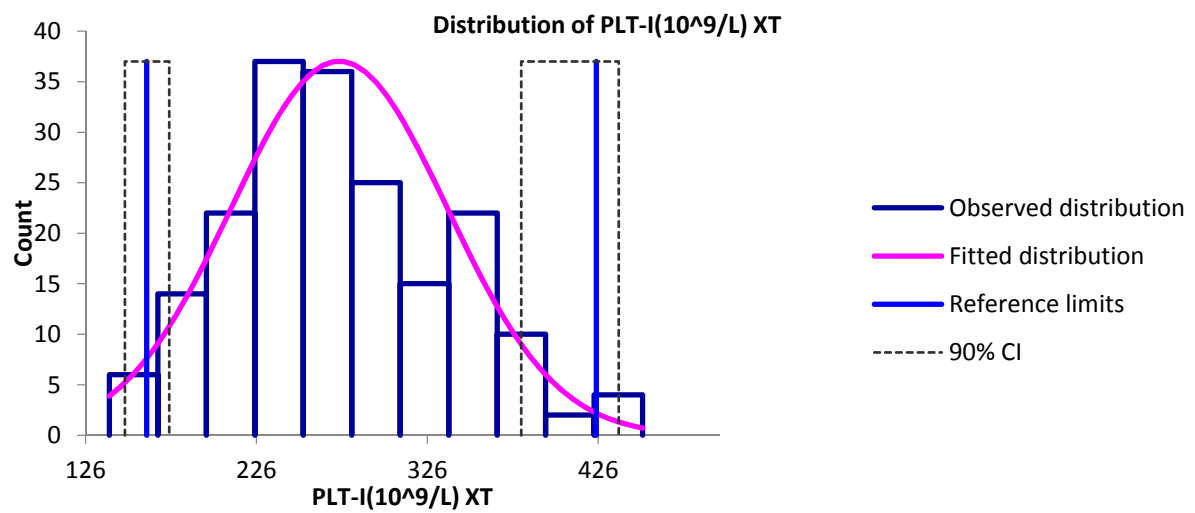
- P-LCR (%) XT-2000iV, n=190



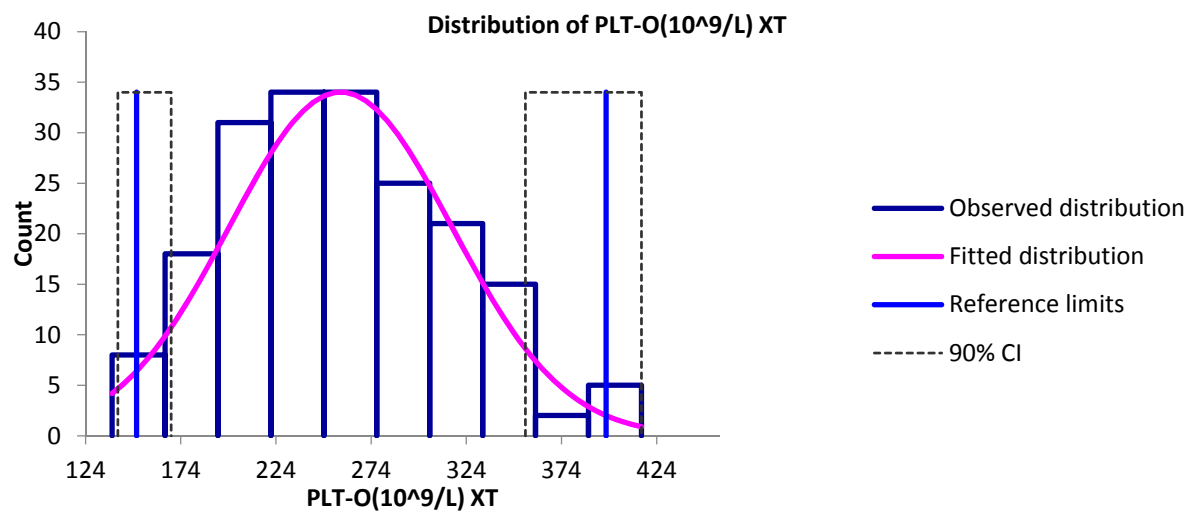
- PDW (fl) XT-2000iV, n=190



- PLT-I ($10^9/L$) XT-2000iV, n=193

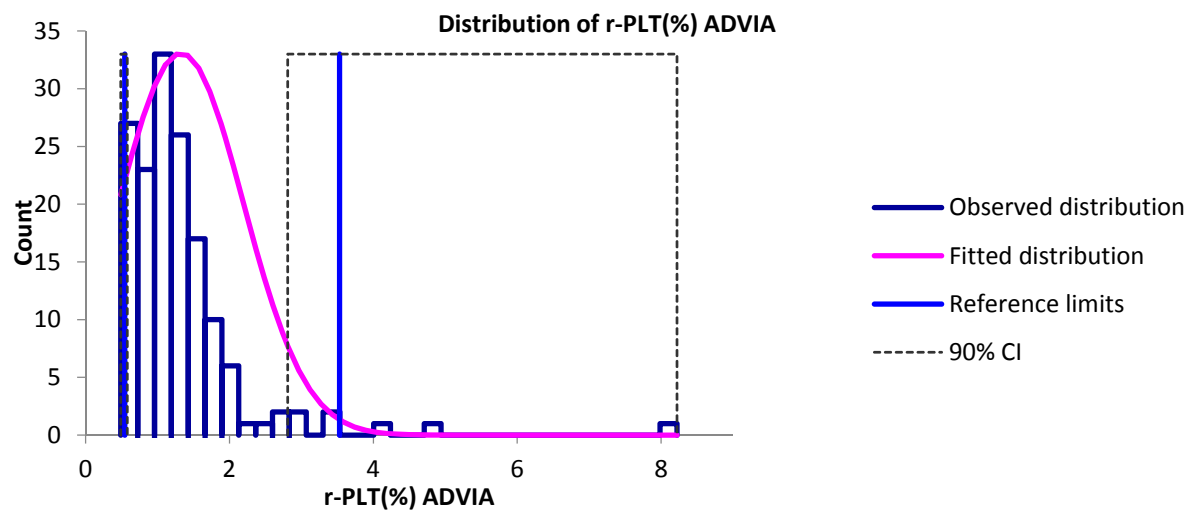


- PLT-O ($10^9/l$) XT-2000iV, n=193

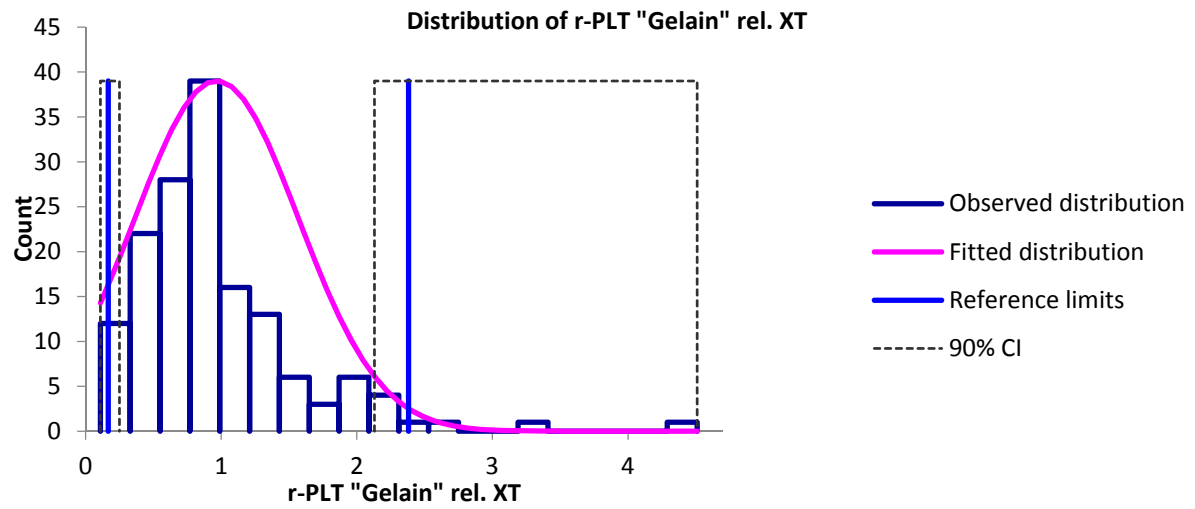


- Beagle (n = 153), retikulierte Thrombozyten

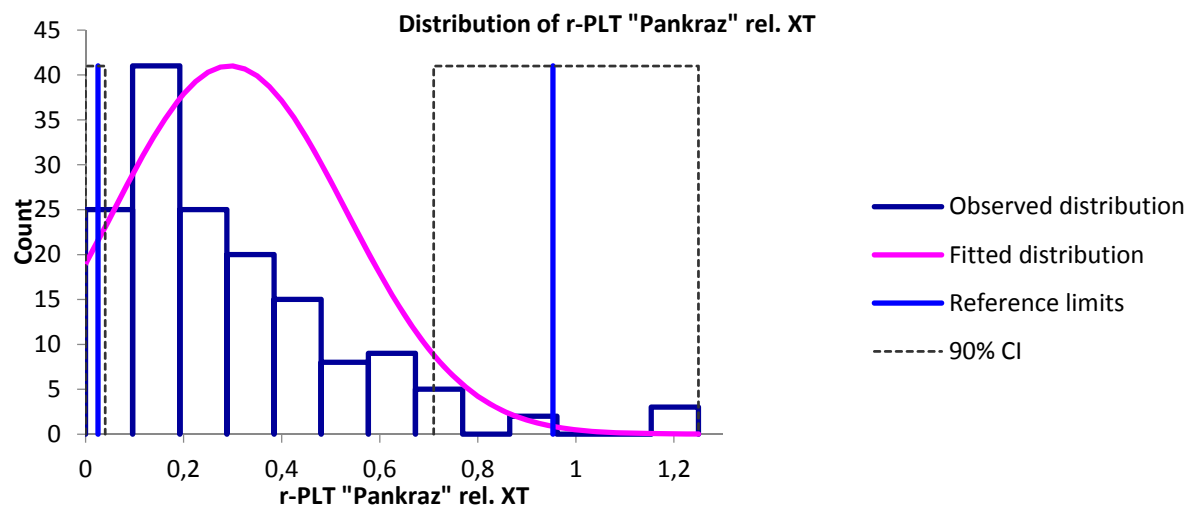
- r-PLT (%) ADVIA 120/2120



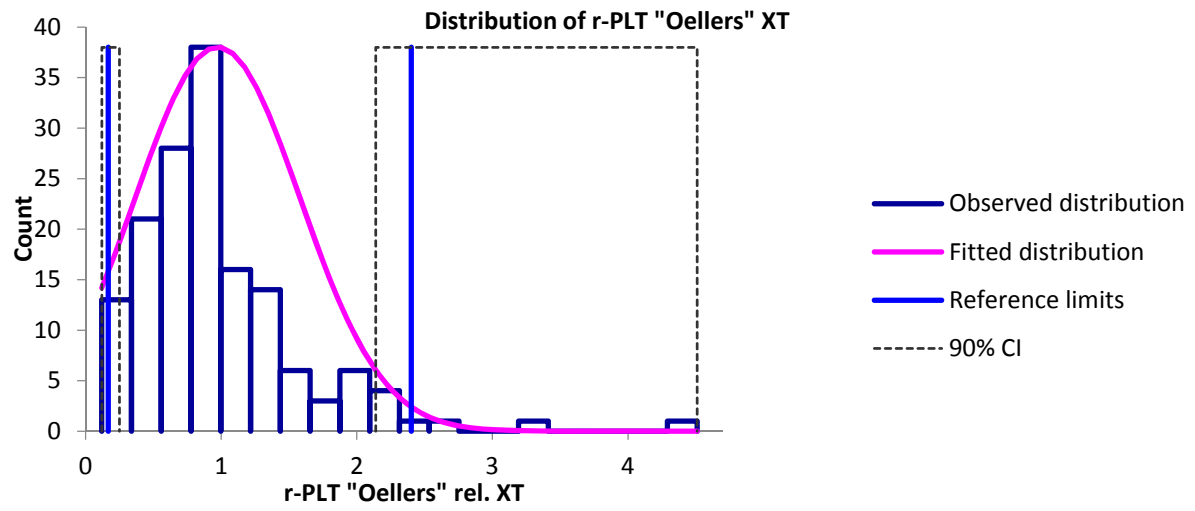
- r-PLT (%) „Gelain“ XT-2000iV



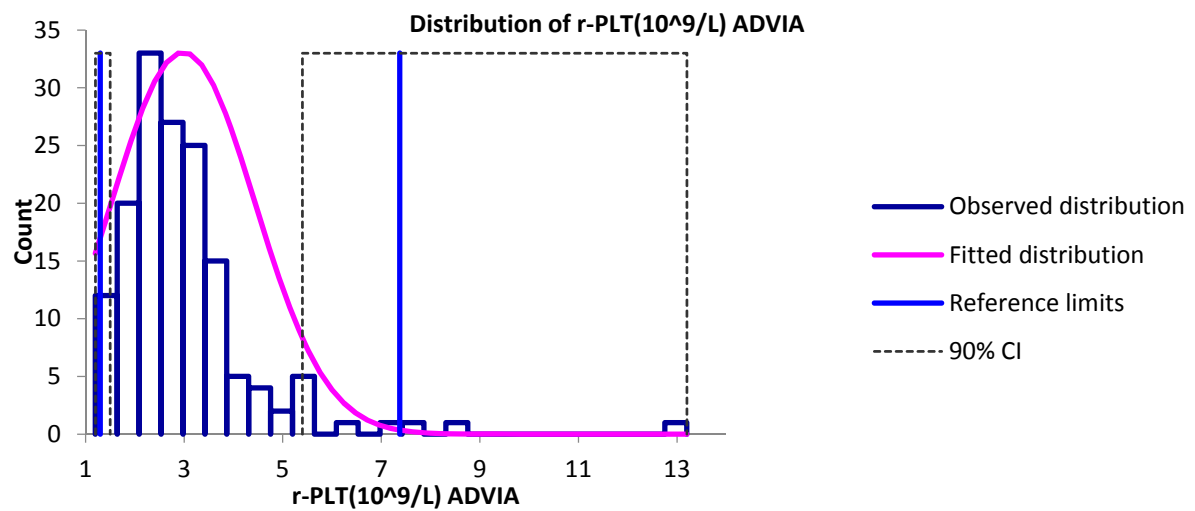
- r-PLT (%) „Pankraz“ XT-2000iV



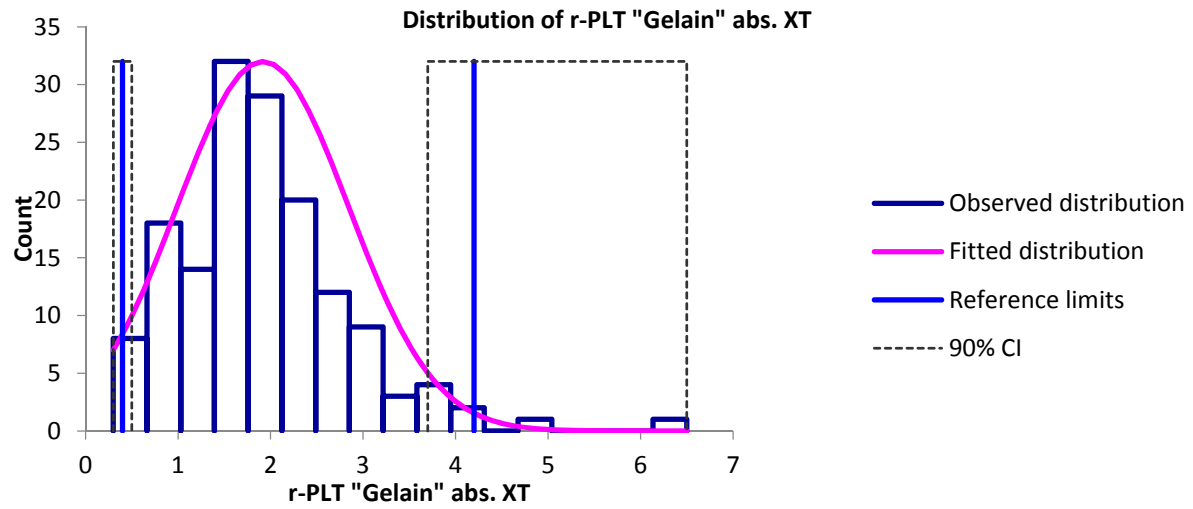
- r-PLT (%) „Oellers“ XT-2000iV



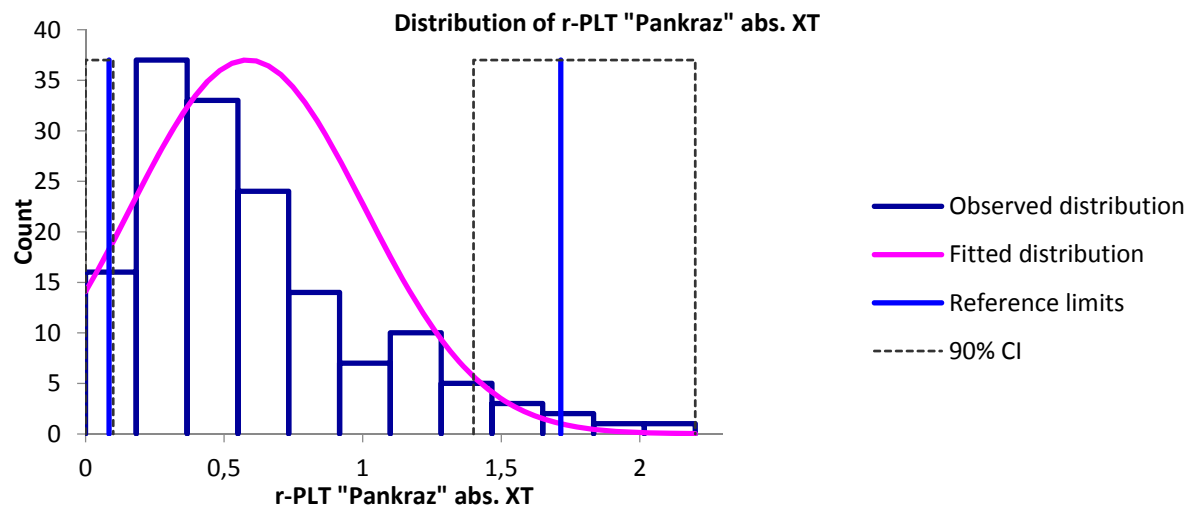
- r-PLT (10^9 /l) ADVIA 120/2120



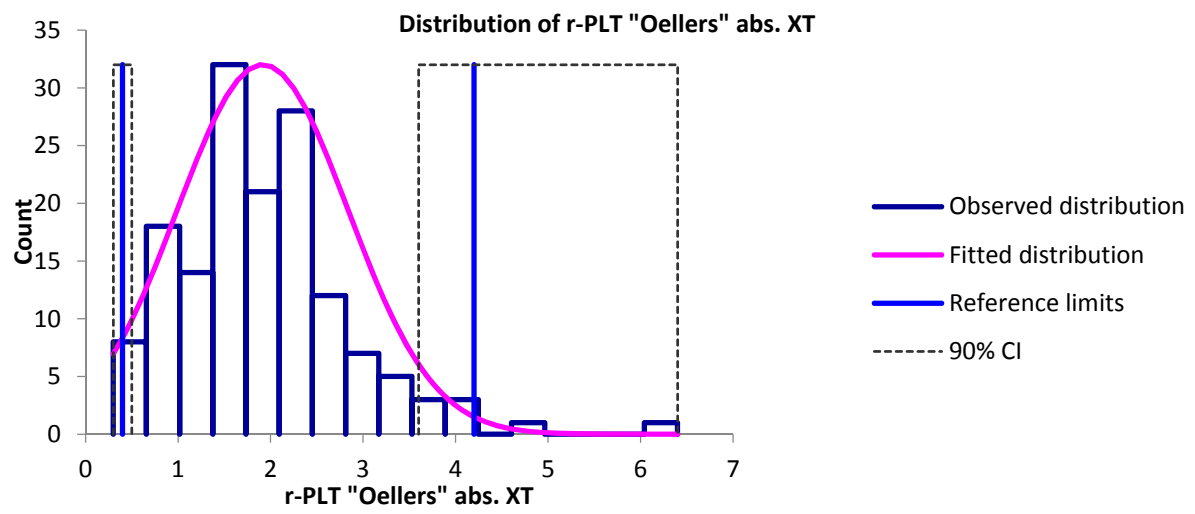
- r-PLT ($10^9/l$) „Gelain“ XT-2000iV



- r-PLT ($10^9/l$) „Pankraz“ XT-2000iV

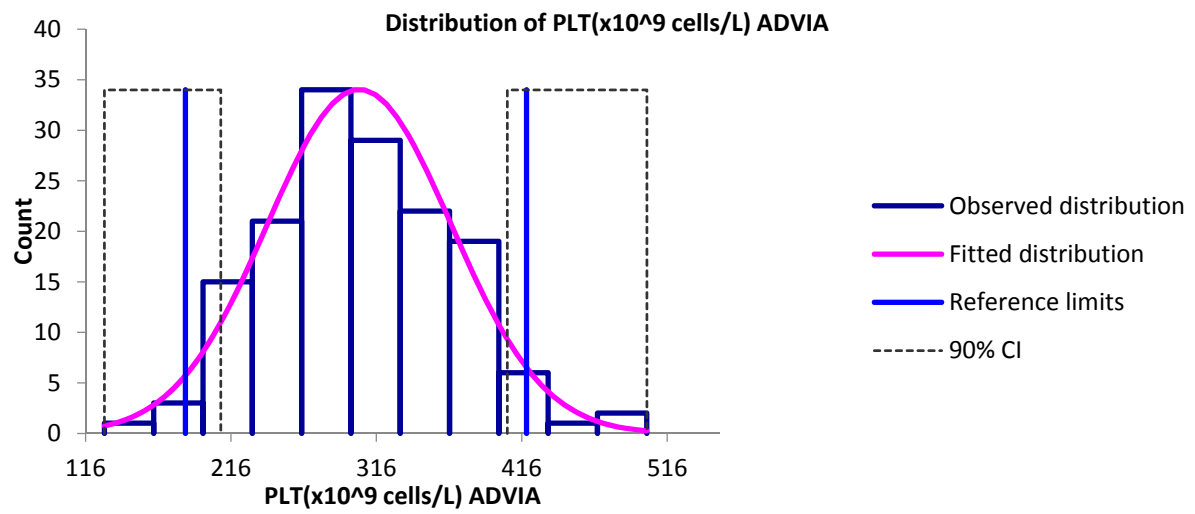


- r-PLT ($10^9/l$) „Oellers“ XT-2000iV

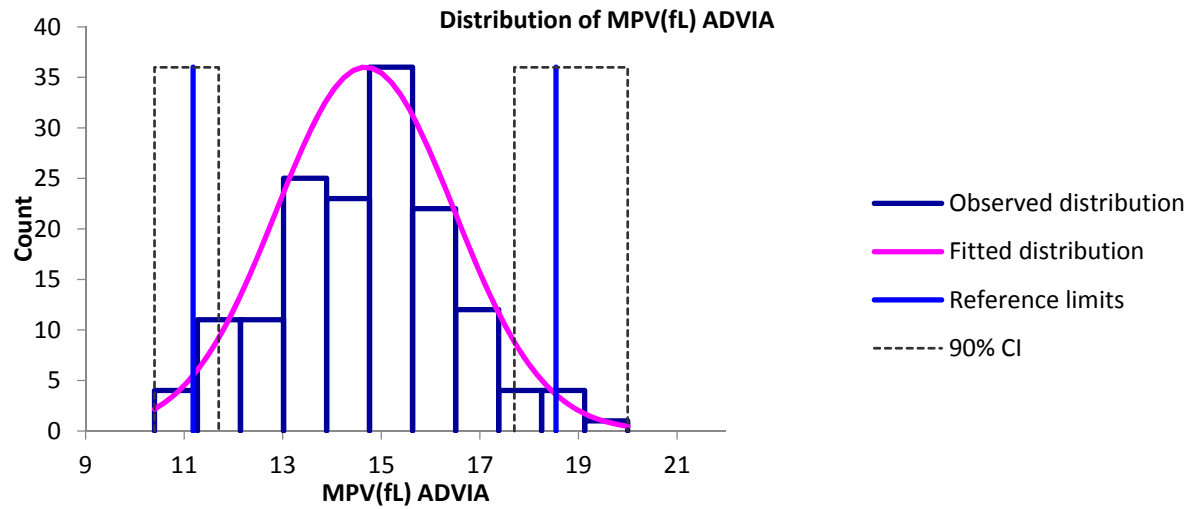


- Beagle (n = 153), Thrombozytenindizes ADVIA 120/2120

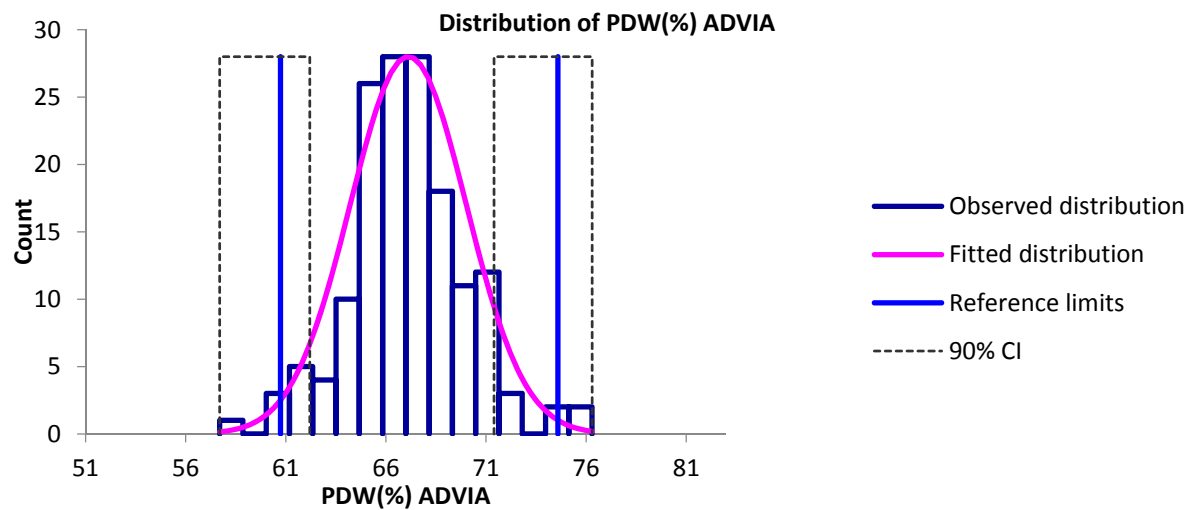
- PLT ($10^9/l$) ADVIA 120/2120



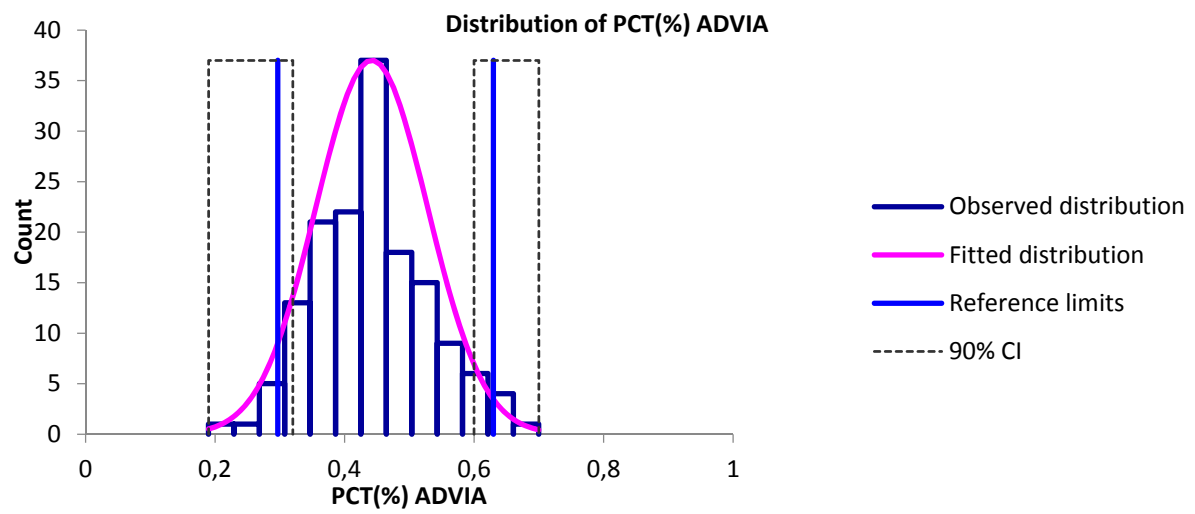
- MPV (fl) ADVIA 120/2120



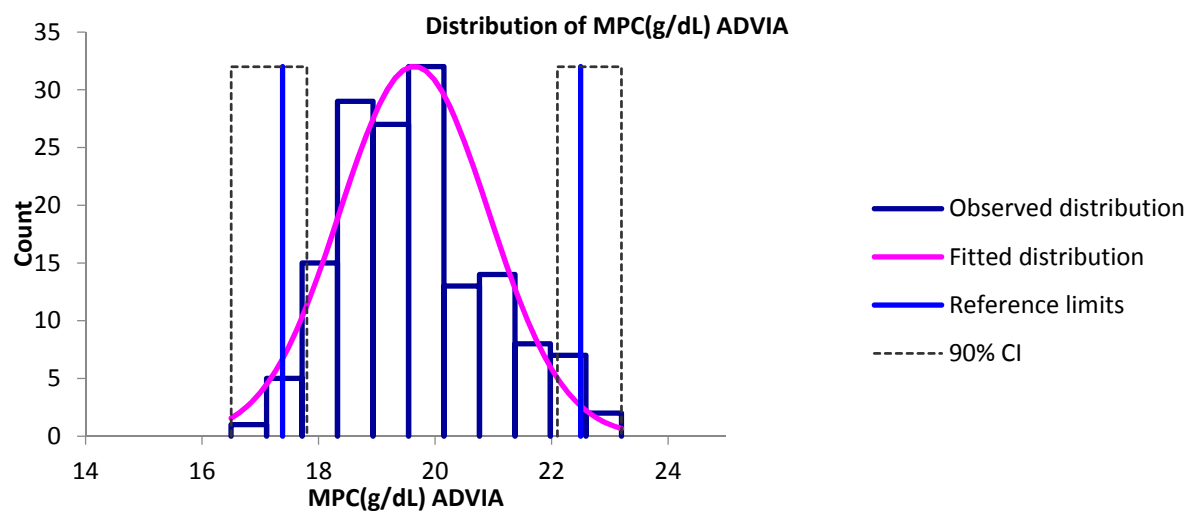
- PDW (%) ADVIA 120/2120



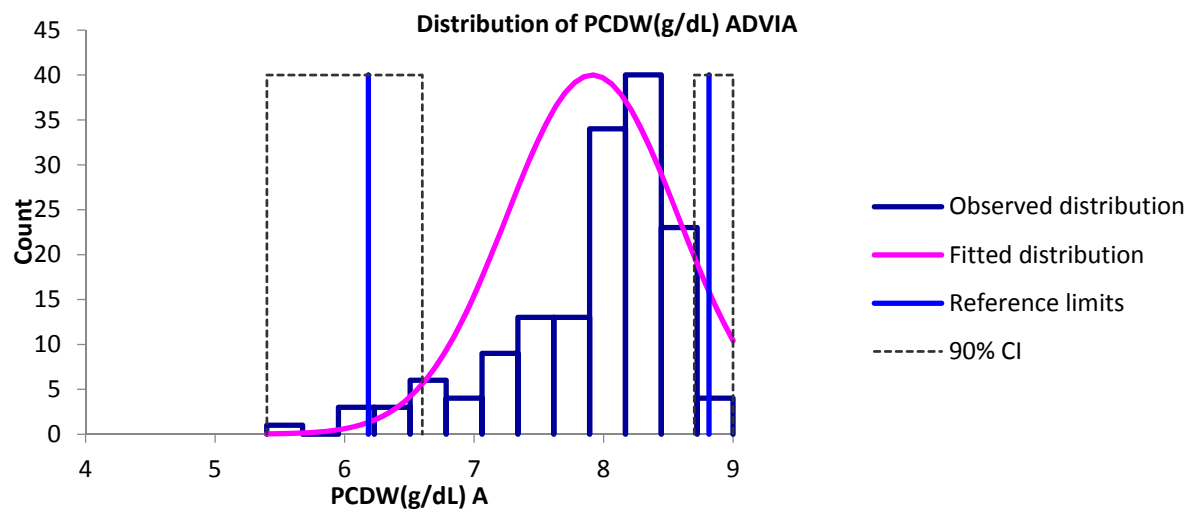
- PCT (%) ADVIA 120/2120



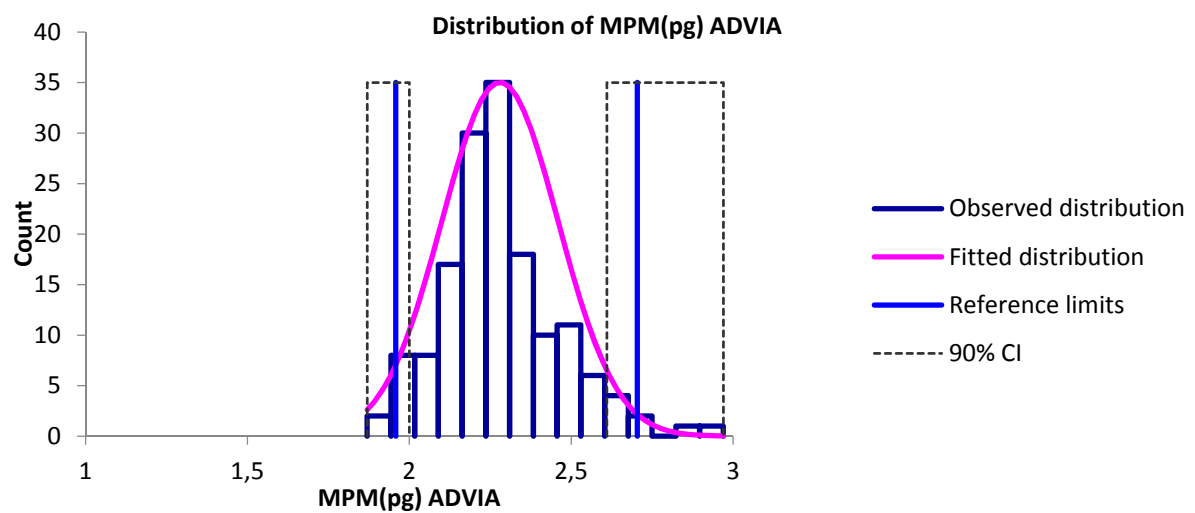
- MPC (g/dl) ADVIA 120/2120



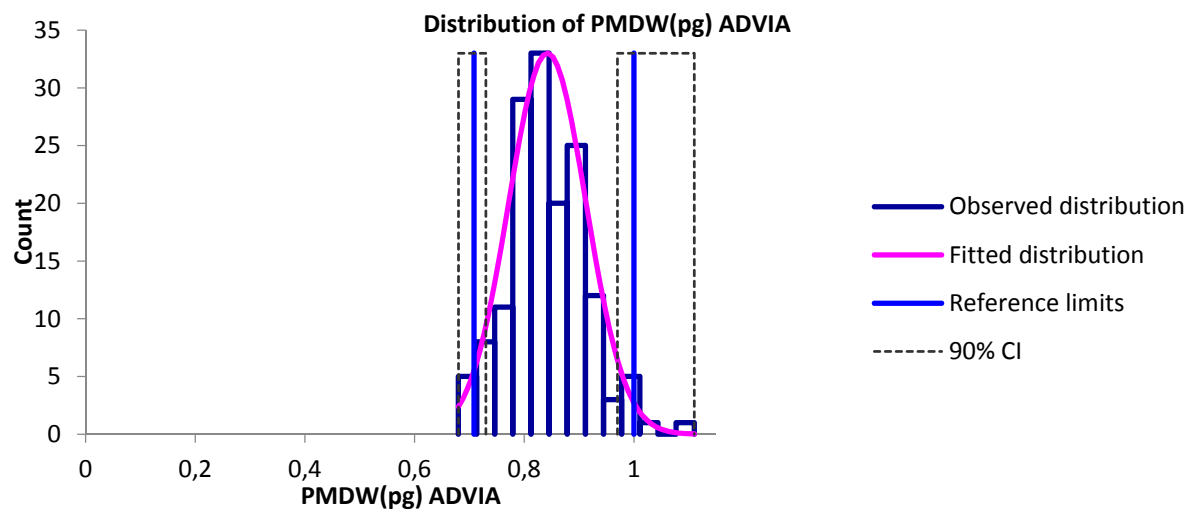
- PCDW (g/dl) ADVIA 120/2120



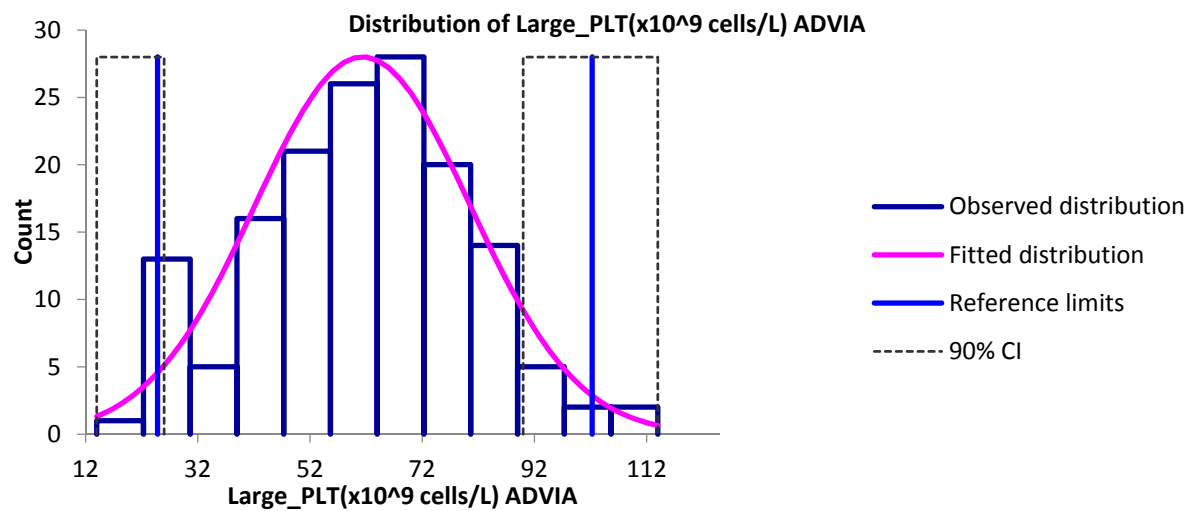
- MPM (pg) ADVIA 120/2120



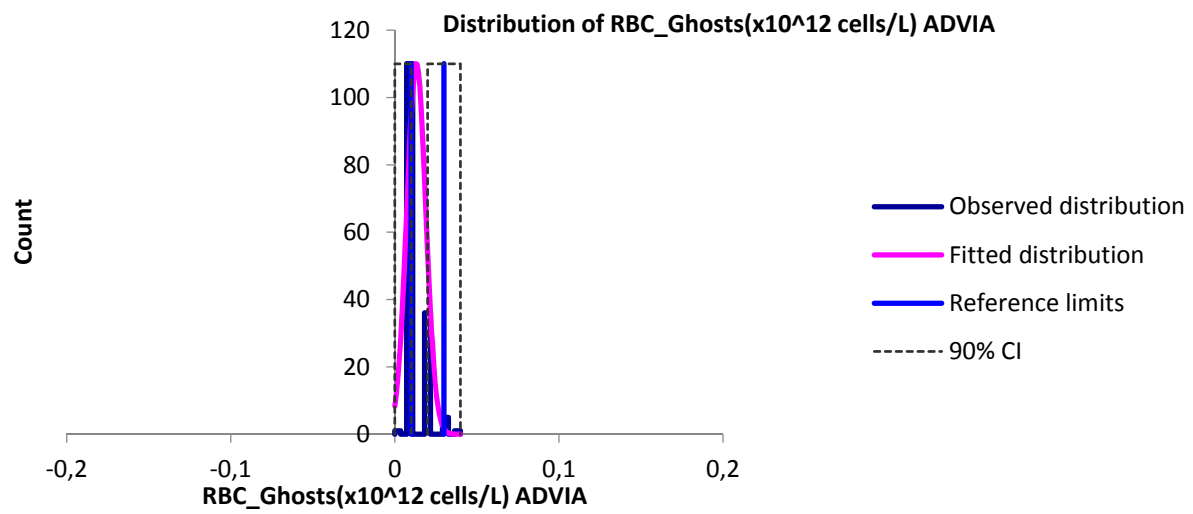
- PMDW (pg) ADVIA 120/2120



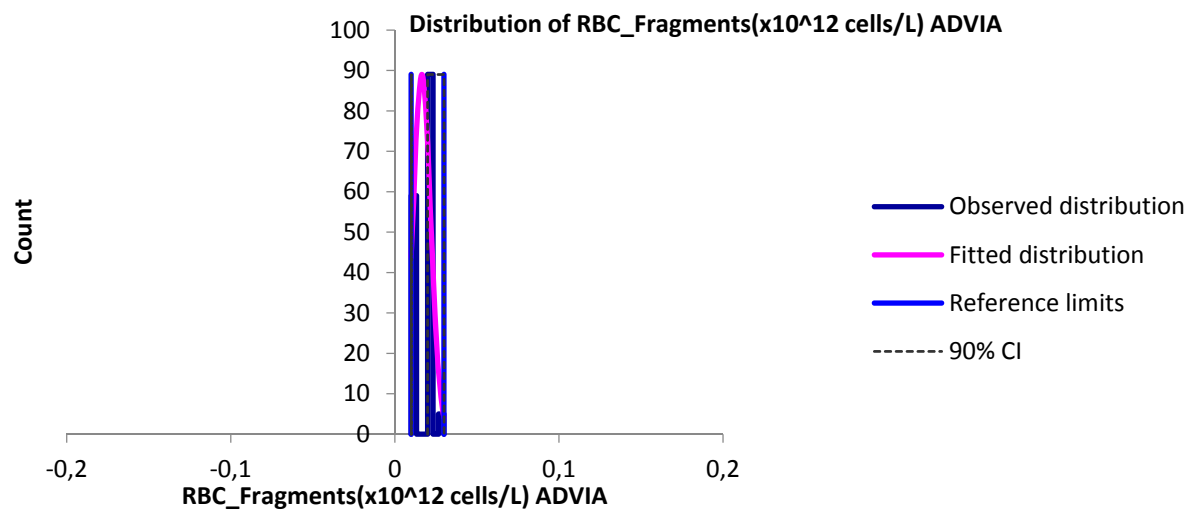
- Large PLT ($\times 10^9/l$) ADVIA 120/2120



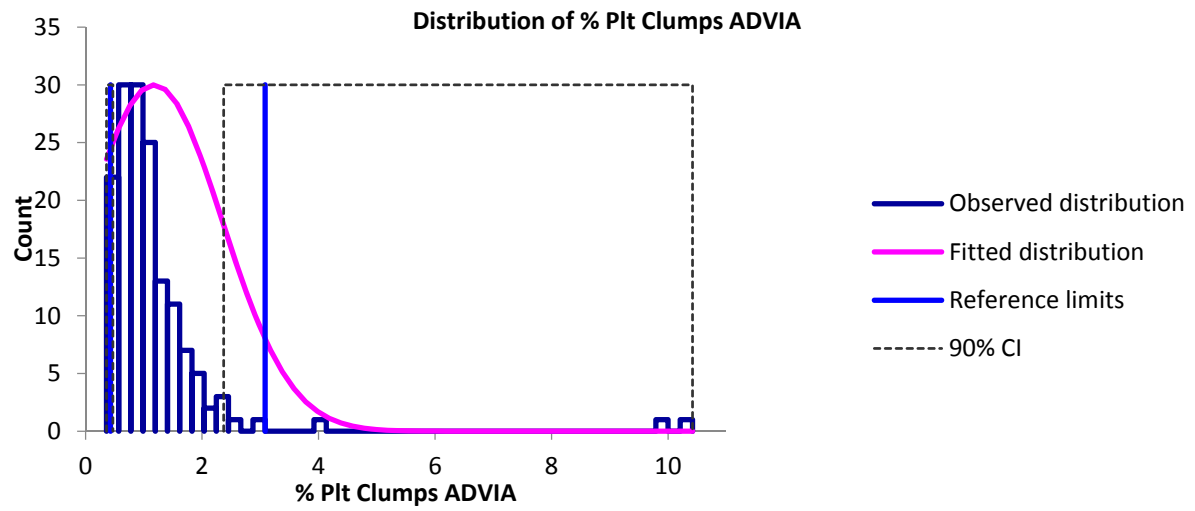
- RBC Ghosts ($10^{12}/l$) ADVIA 120/2120



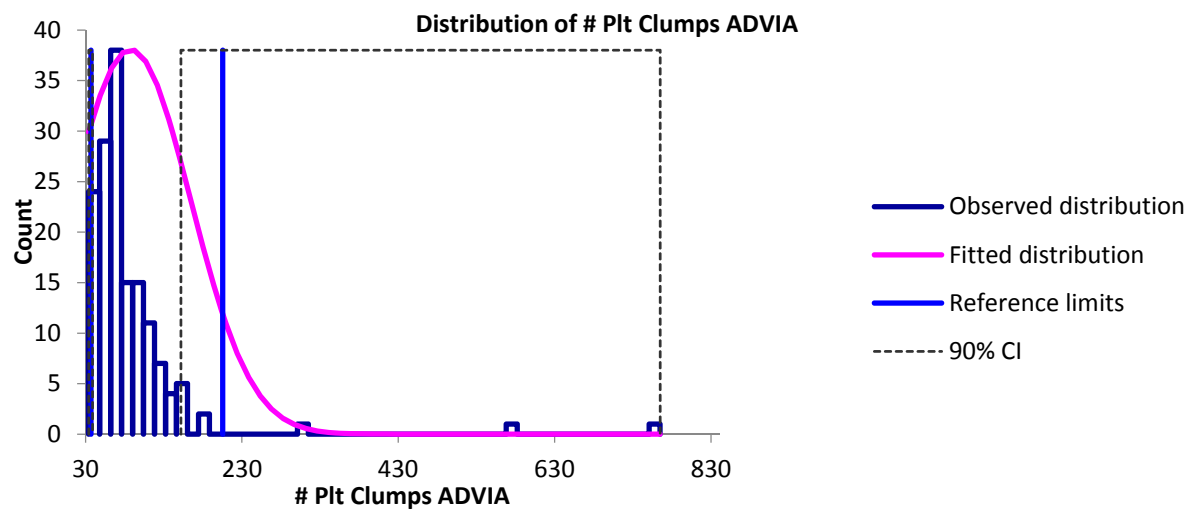
- RBC Fragments ($10^{12}/l$) ADVIA 120/2120



- % Plt Clumps ADVIA 120/2120

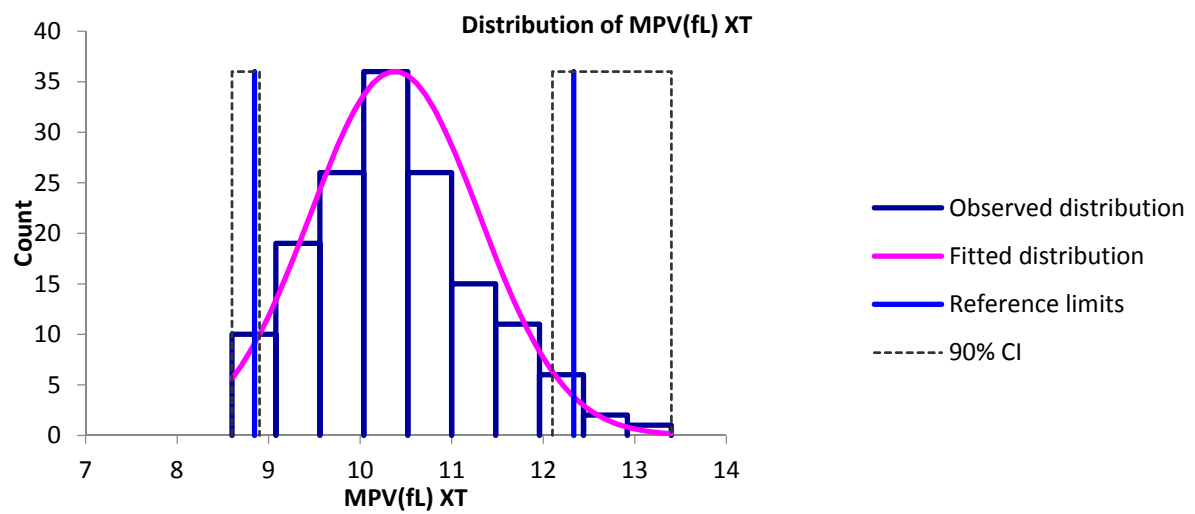


- # Plt Clumps (number events) ADVIA 120/2120

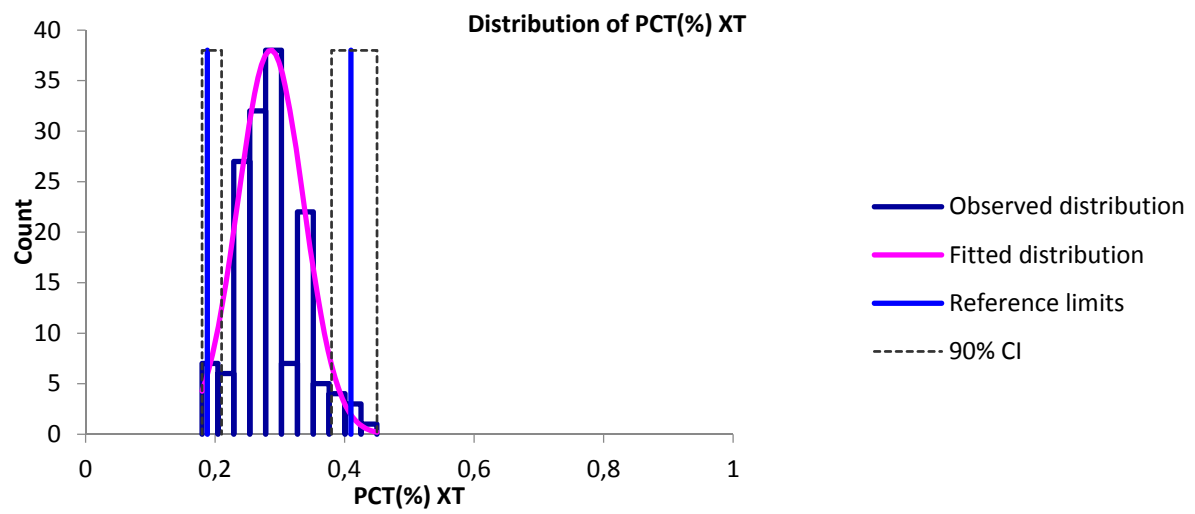


- Beagle (n = 153), Thrombozytenindizes XT-2000iV

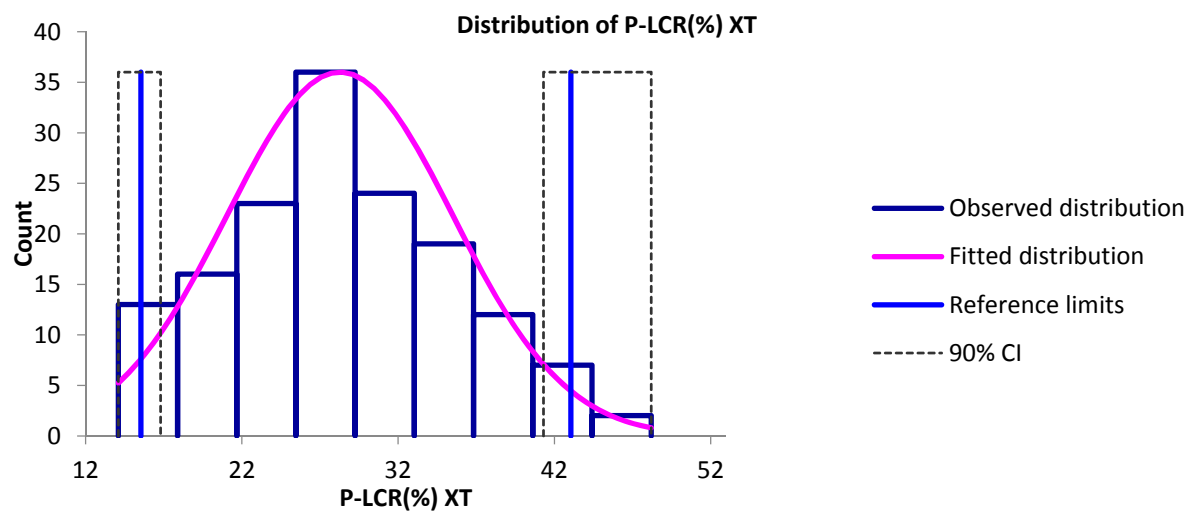
- MPV (fl) XT-2000iV, n=152



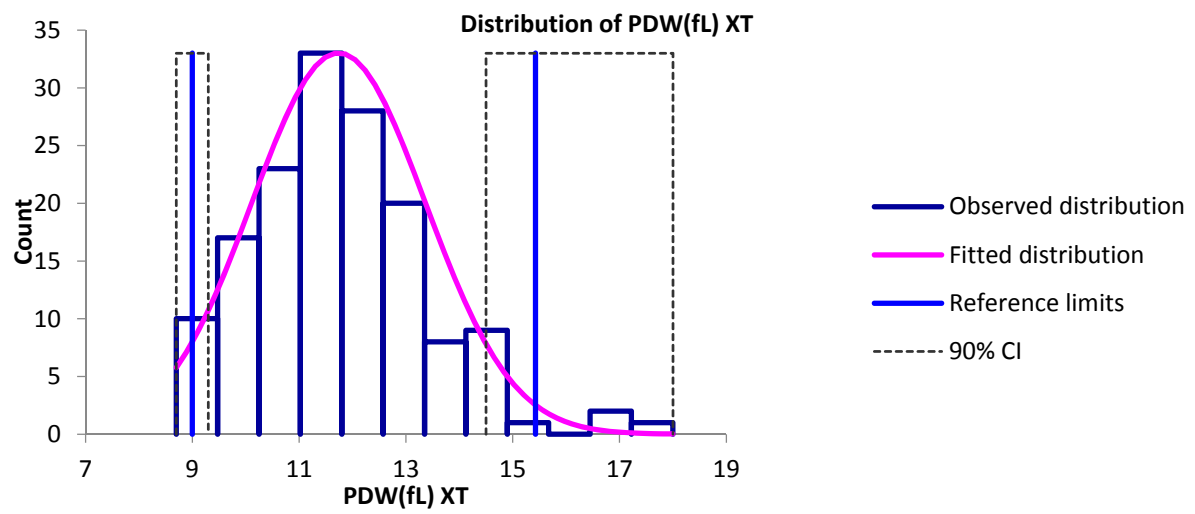
- PCT (%) XT-2000iV, n=152



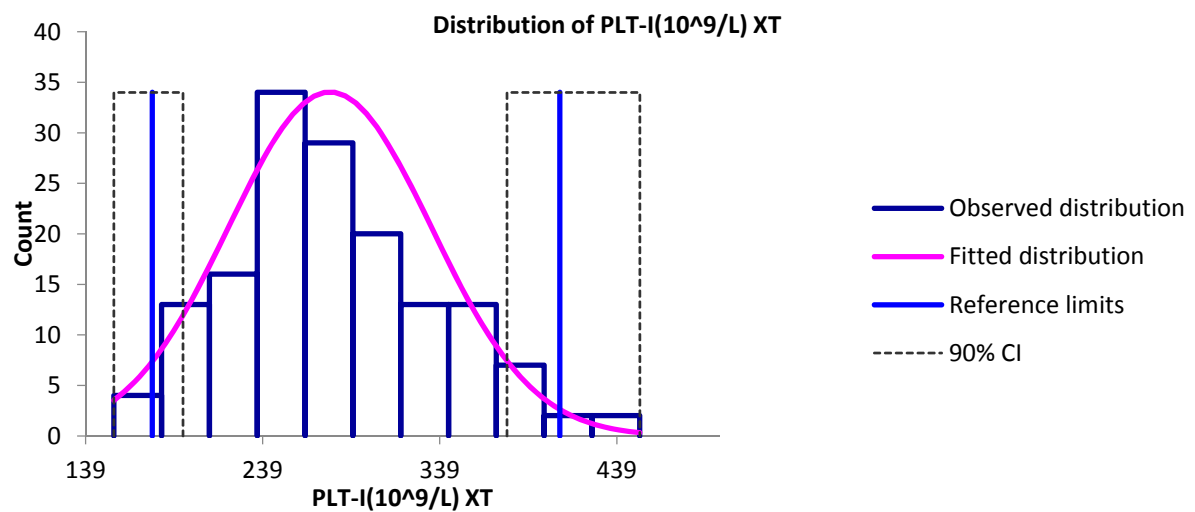
- P-LCR (%) XT-2000iV, n=152



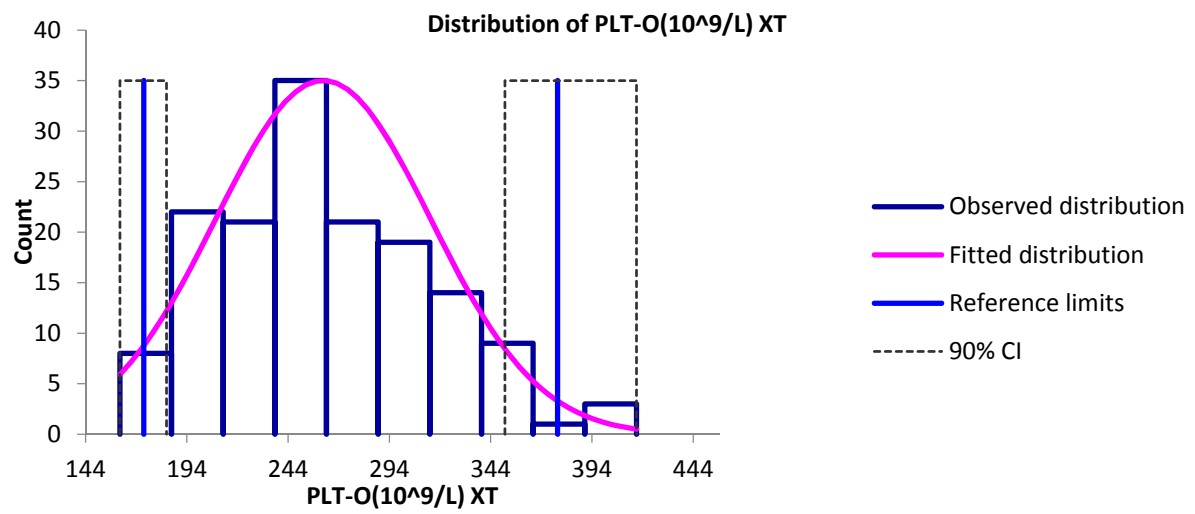
- PDW (fl) XT-2000iV, n=152



- PLT-I ($10^9/L$) XT-2000iV, n=153

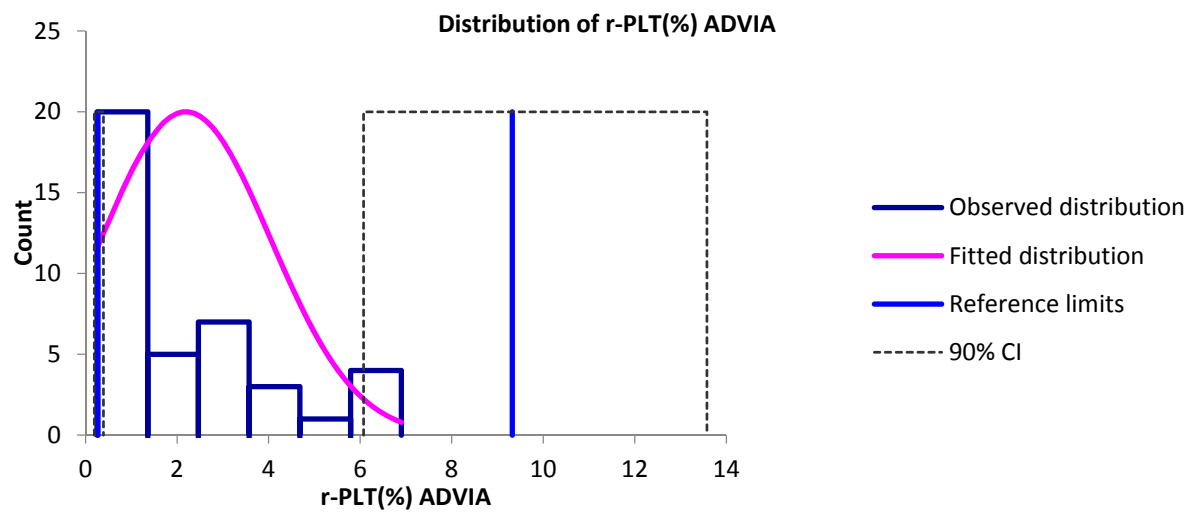


- PLT-O ($10^9/L$) XT-2000iV, n=153

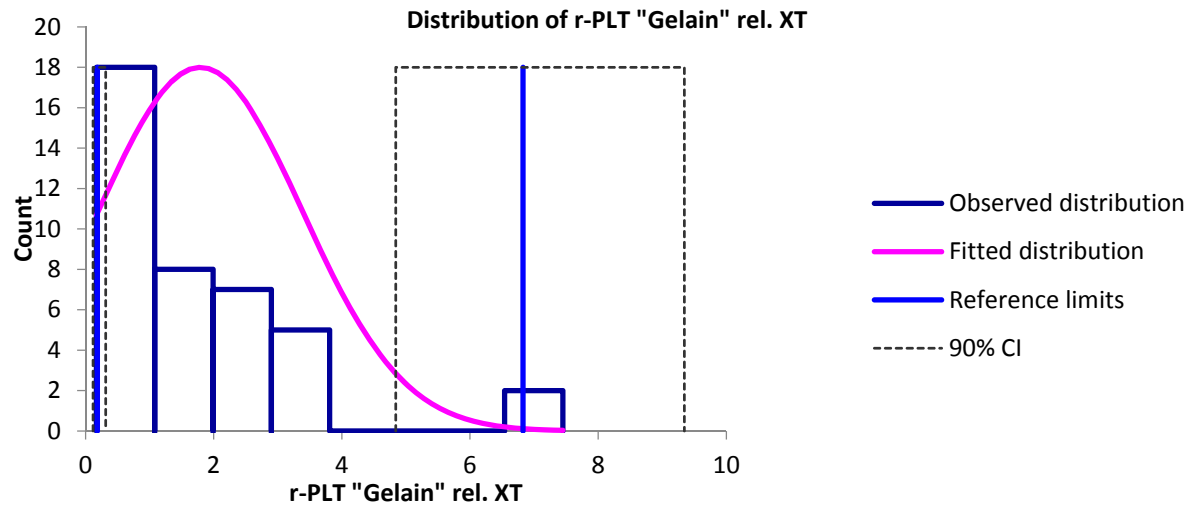


- Hunde verschiedener Rassen (n = 40), retikulierte Thrombozyten

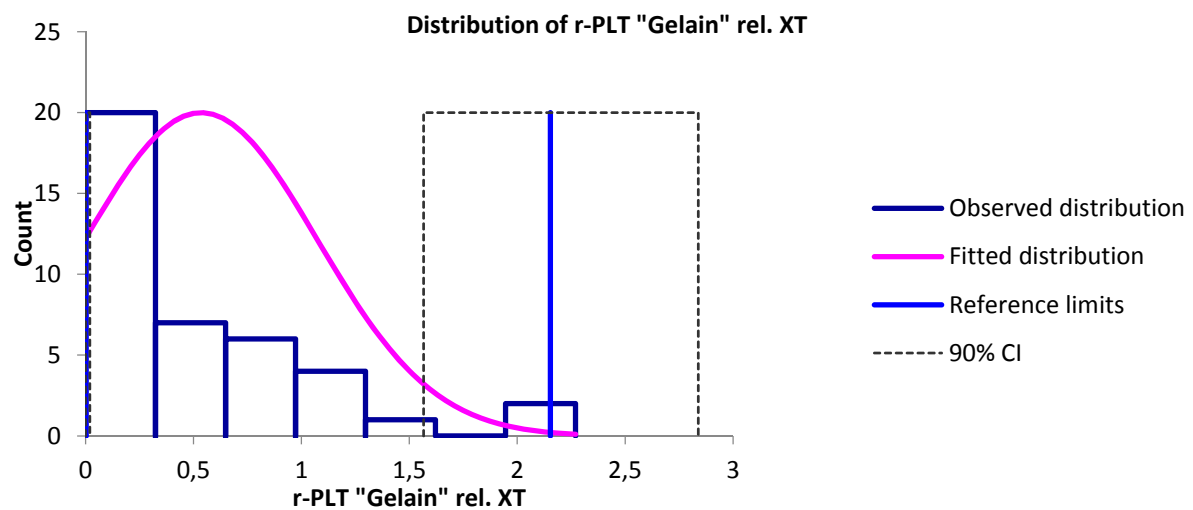
- r-PLT (%) ADVIA 120/2120



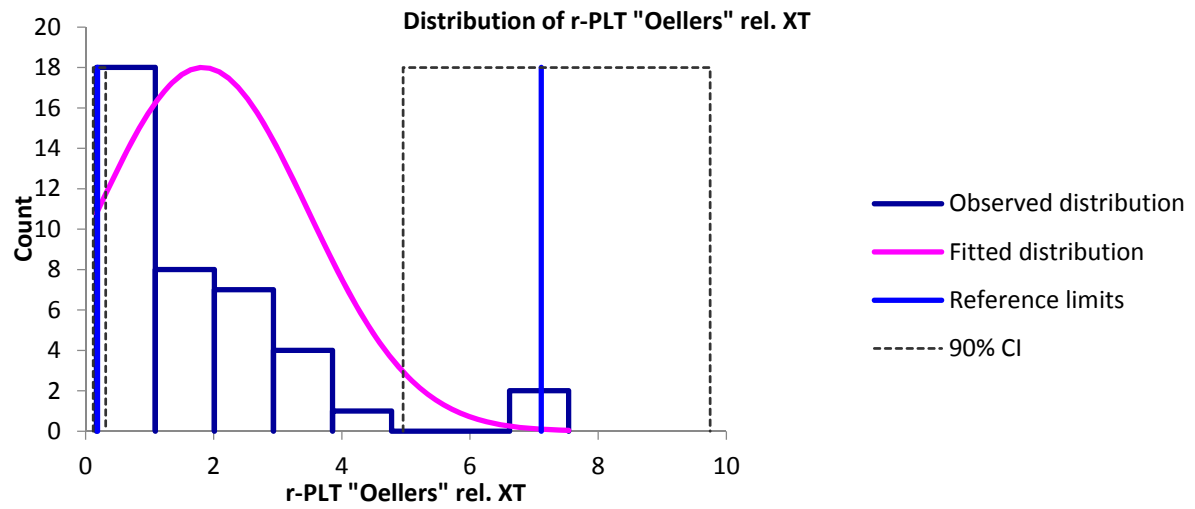
- r-PLT (%) „Gelain“ XT-2000iV



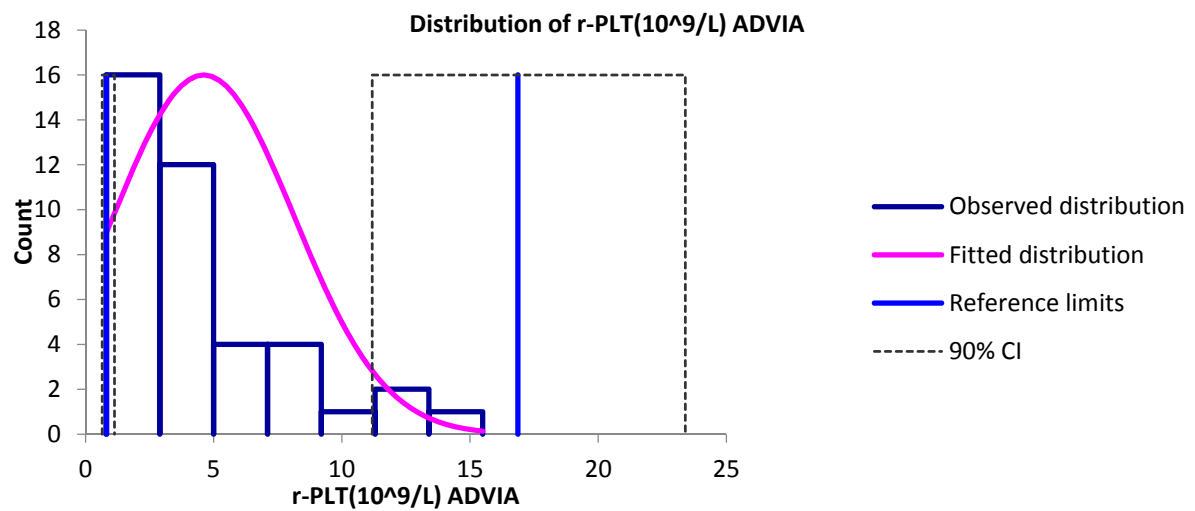
- r-PLT (%) „Pankraz“ XT-2000iV



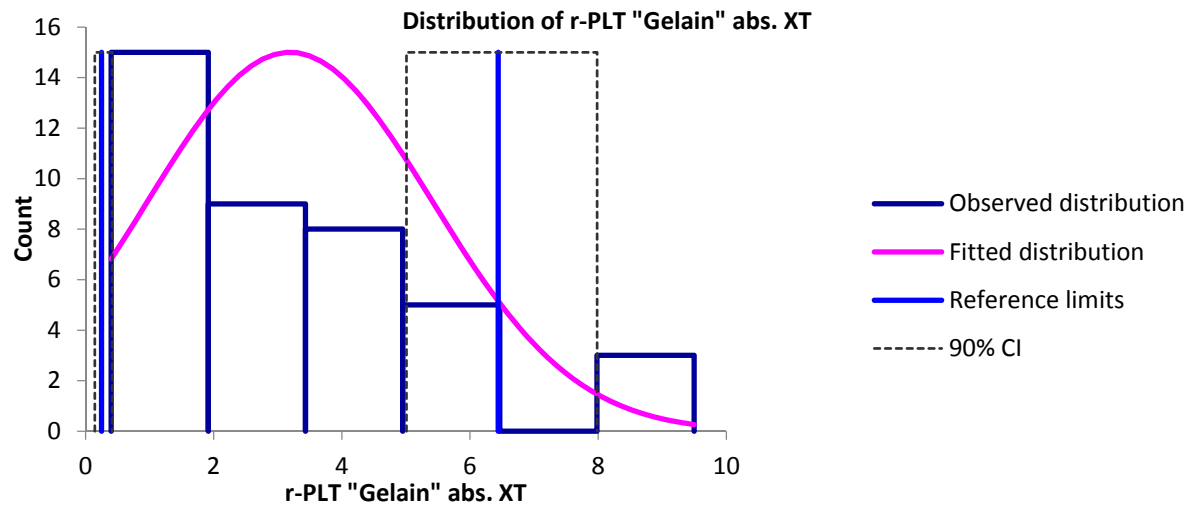
- r-PLT (%) „Oellers“ XT-2000iV



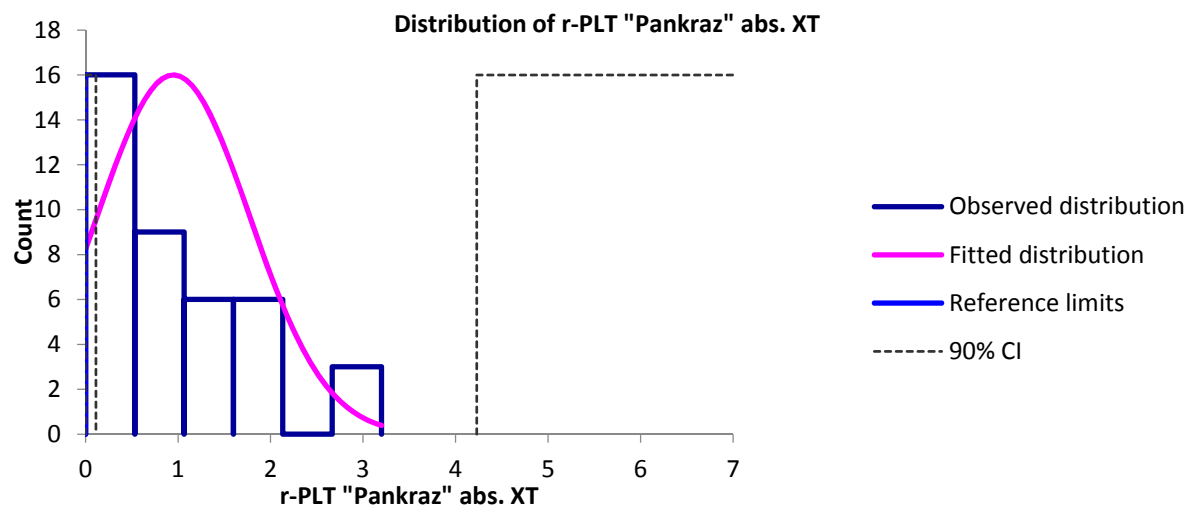
- r-PLT ($10^9/l$) ADVIA 120/2120



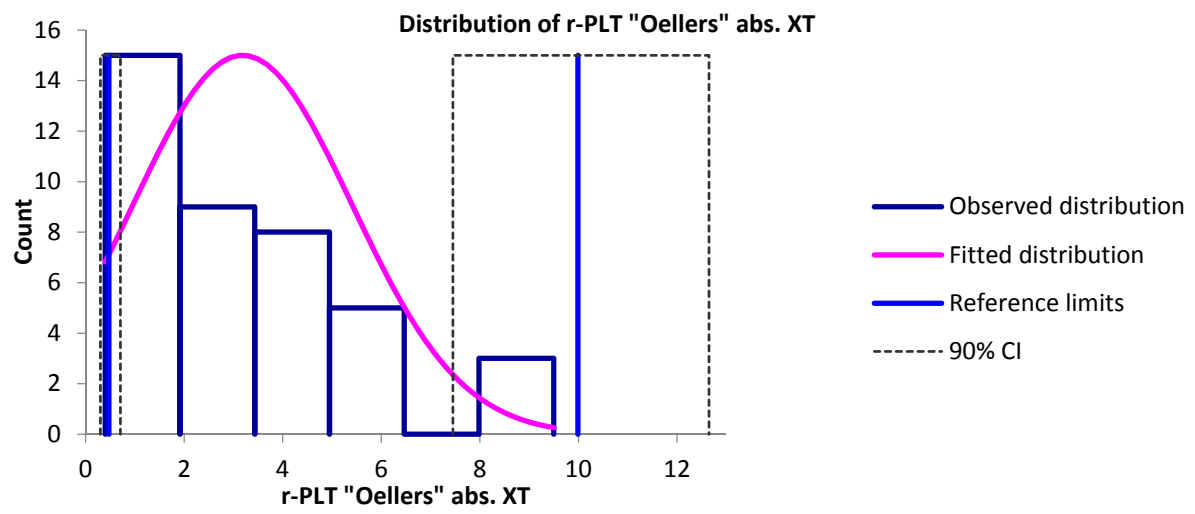
- r-PLT ($10^9/l$) „Gelain“ XT-2000iV



- r-PLT ($10^9/l$) „Pankraz“ XT-2000iV

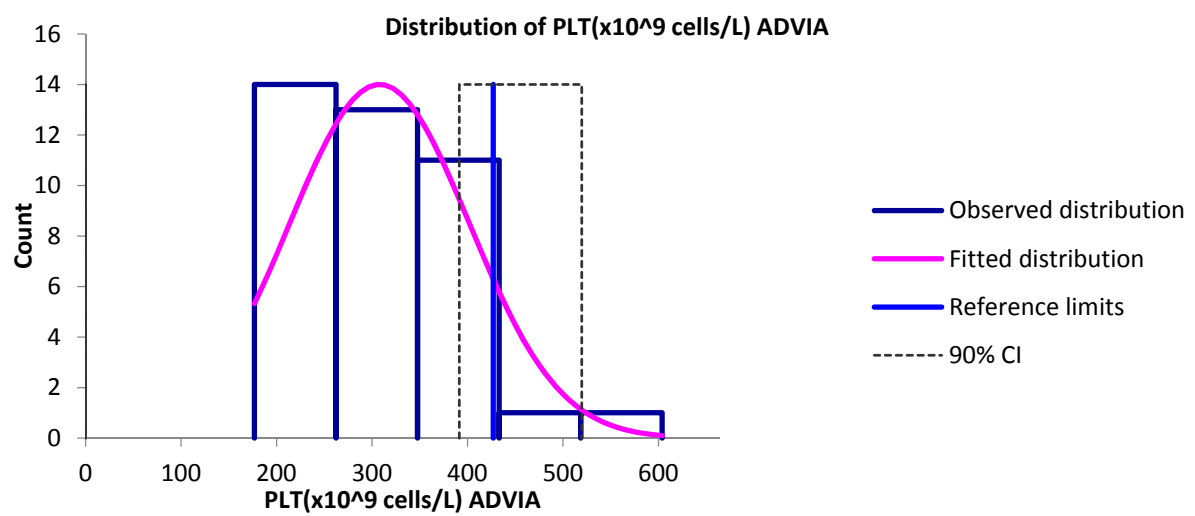


- r-PLT ($10^9/l$) „Oellers“ XT-2000iV

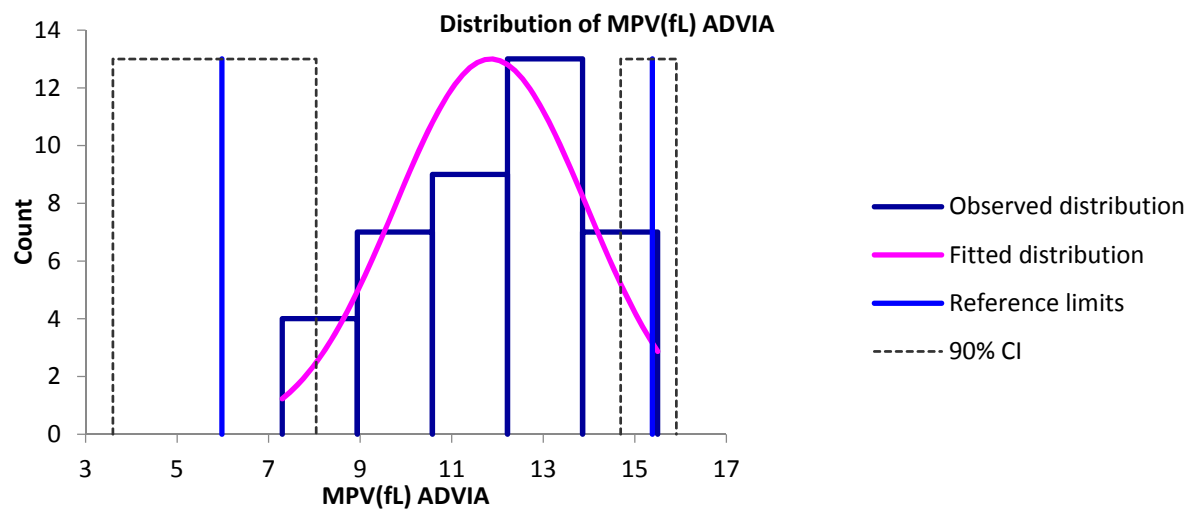


- Hunde verschiedener Rassen (n = 40), Thrombozytenindizes ADVIA 120/2120

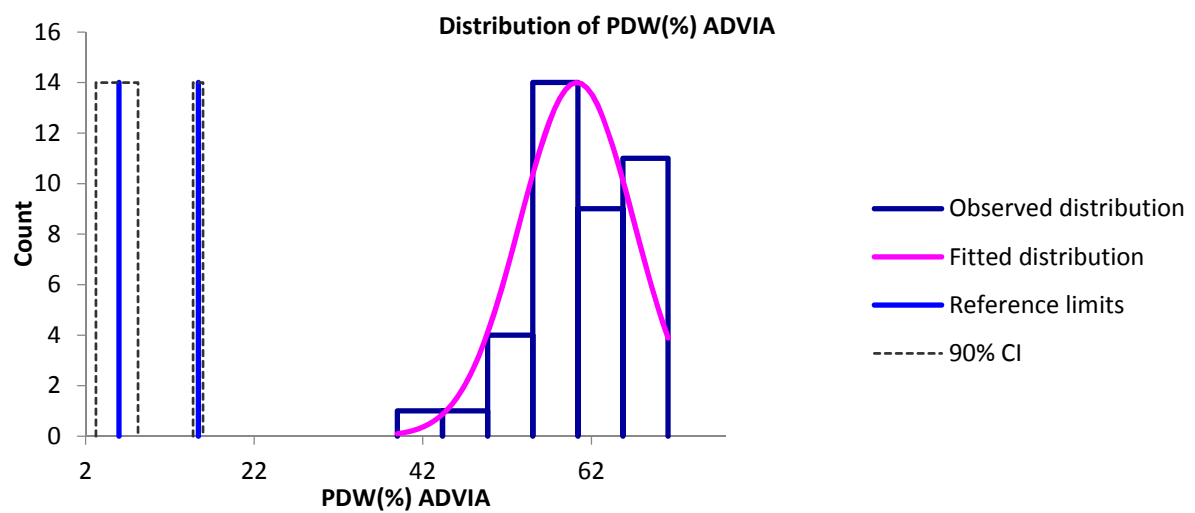
- PLT ($10^9/l$) ADVIA 120/2120



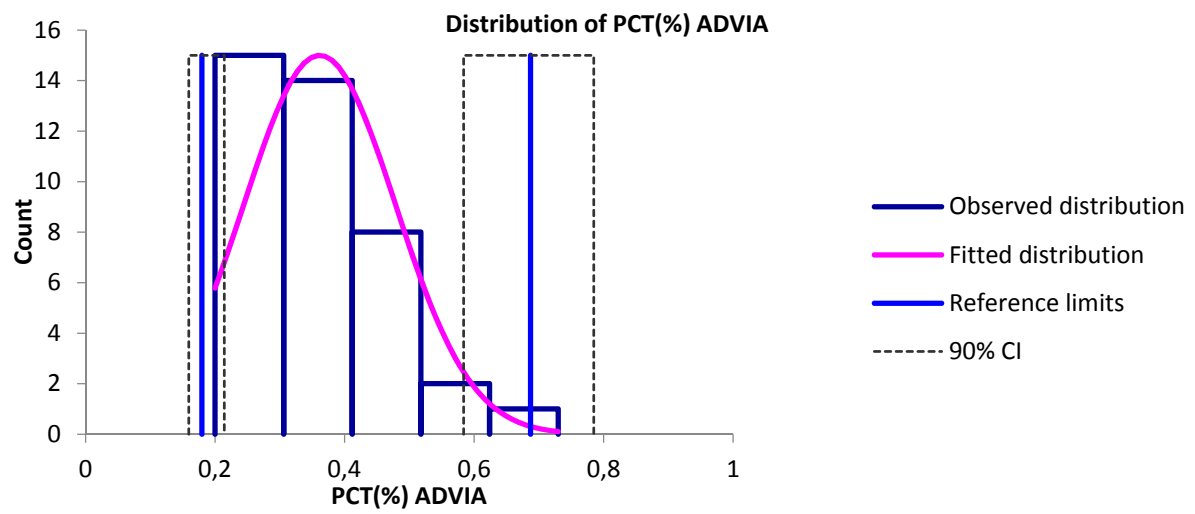
- MPV (fL) ADVIA 120/2120



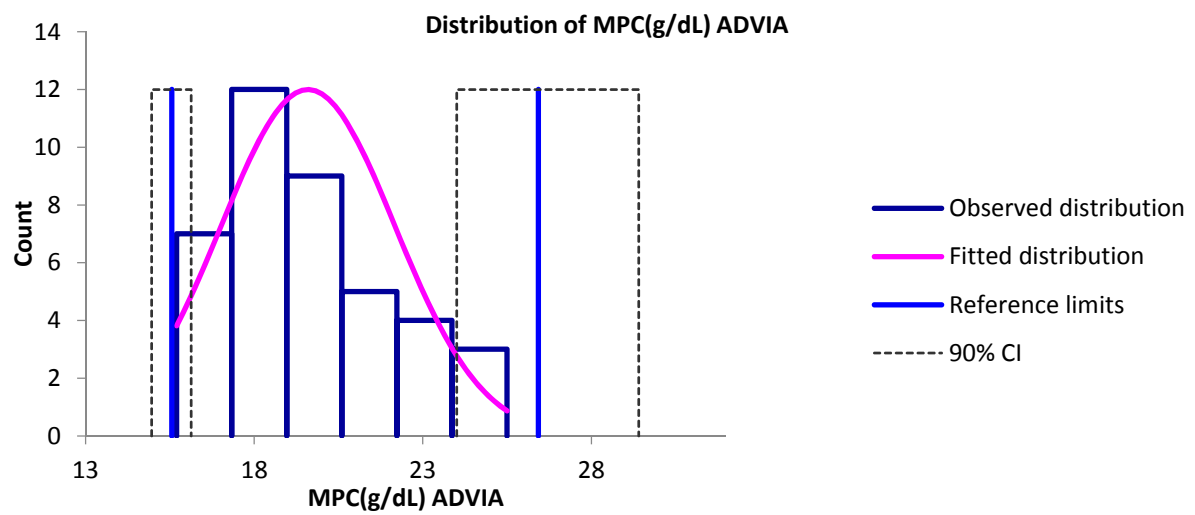
- PDW (%) ADVIA 120/2120



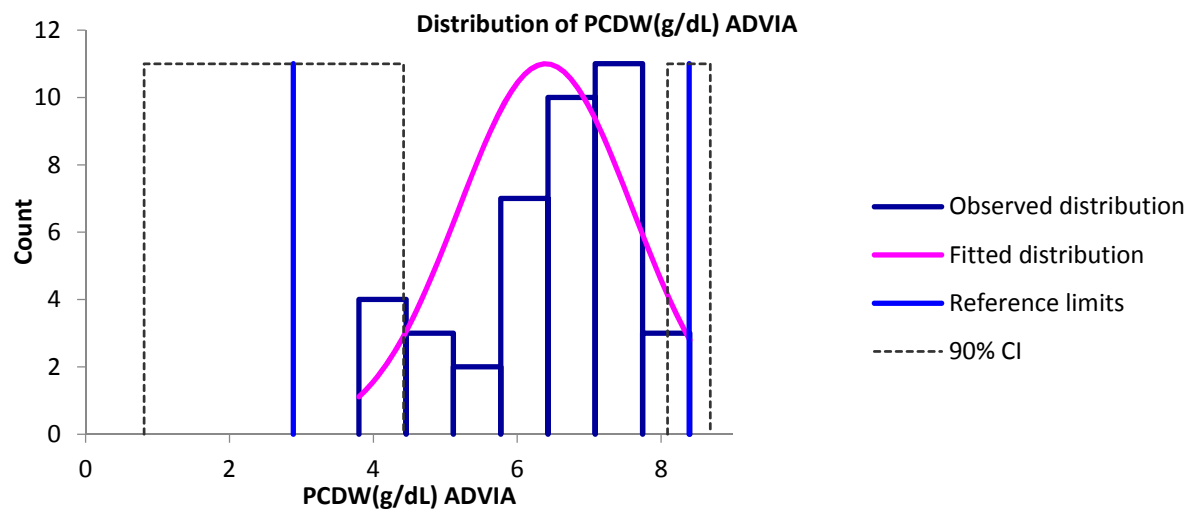
- PCT (%) ADVIA 120/2120



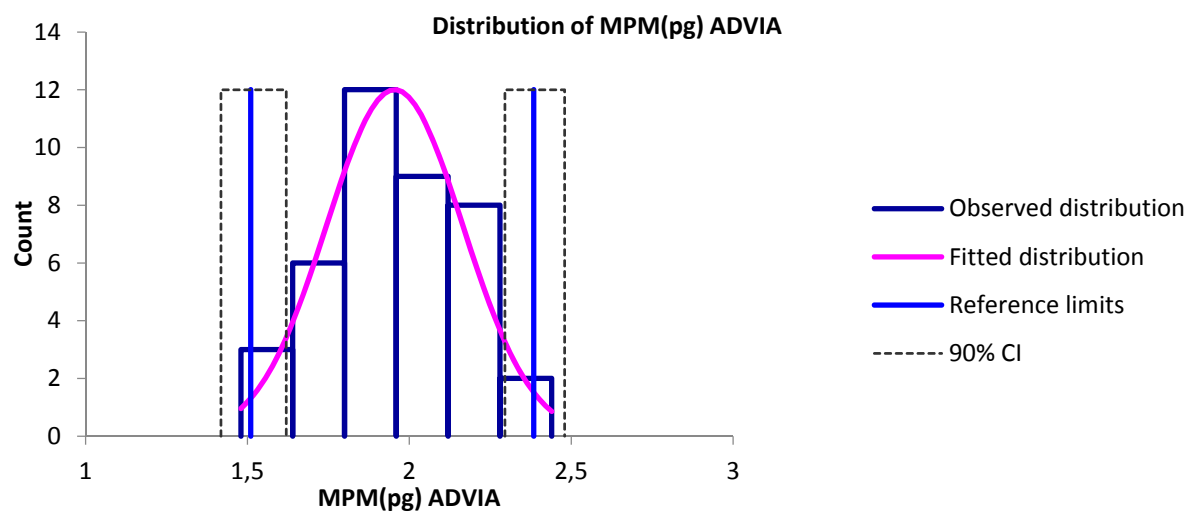
- MPC (g/dl) ADVIA 120/2120



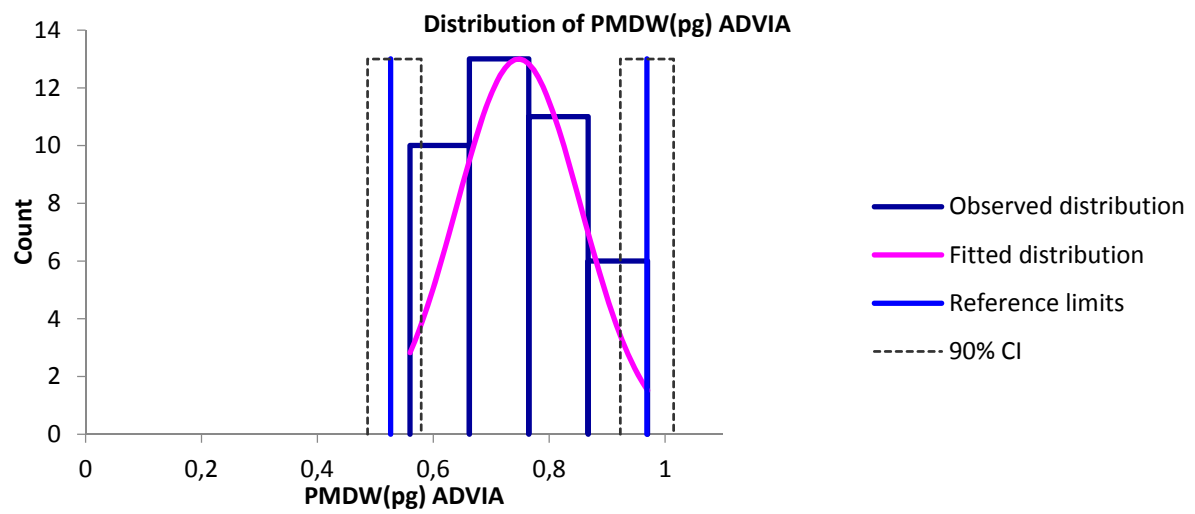
- PCDW (g/dl) ADVIA 120/2120



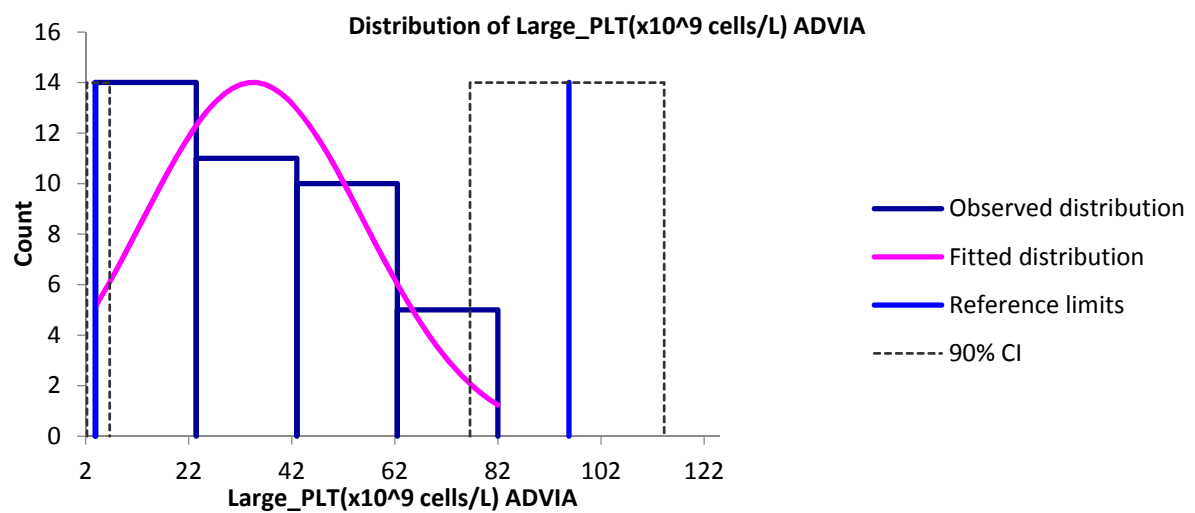
- MPM (pg) ADVIA 120/2120



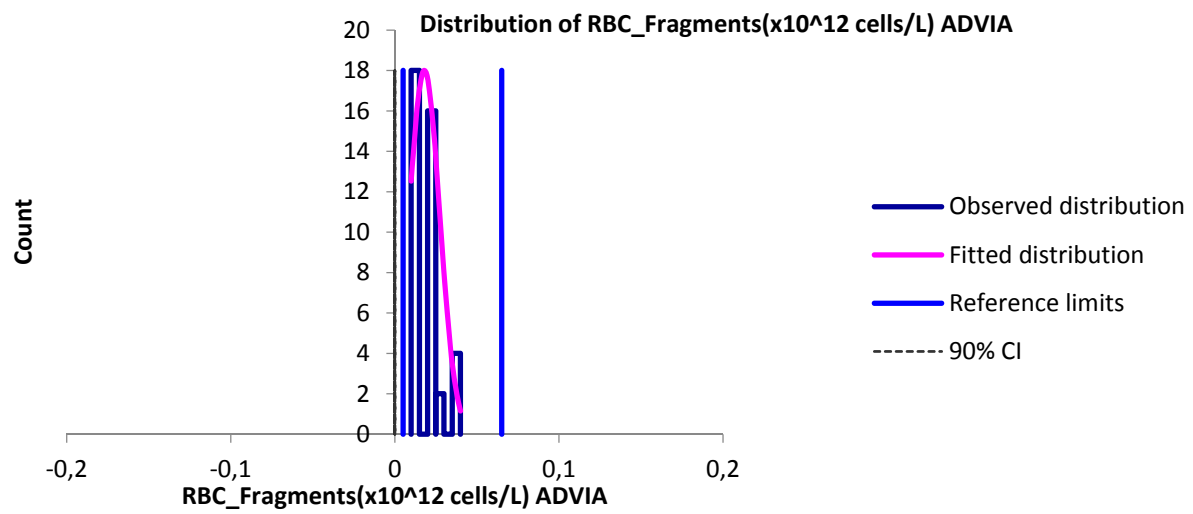
- PMDW (pg) ADVIA 120/2120



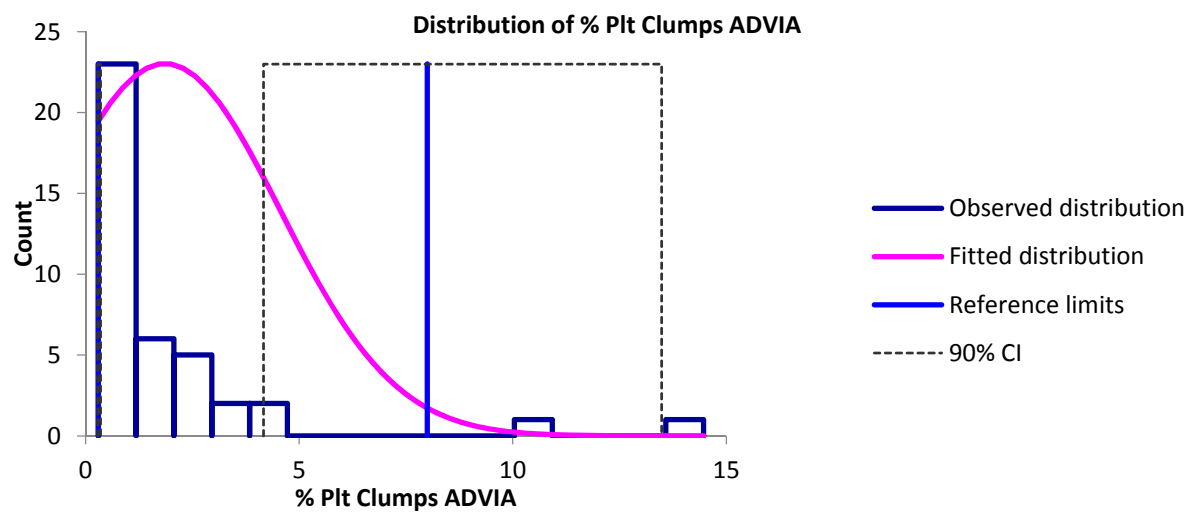
- Large PLT ($10^9/l$) ADVIA 120/2120



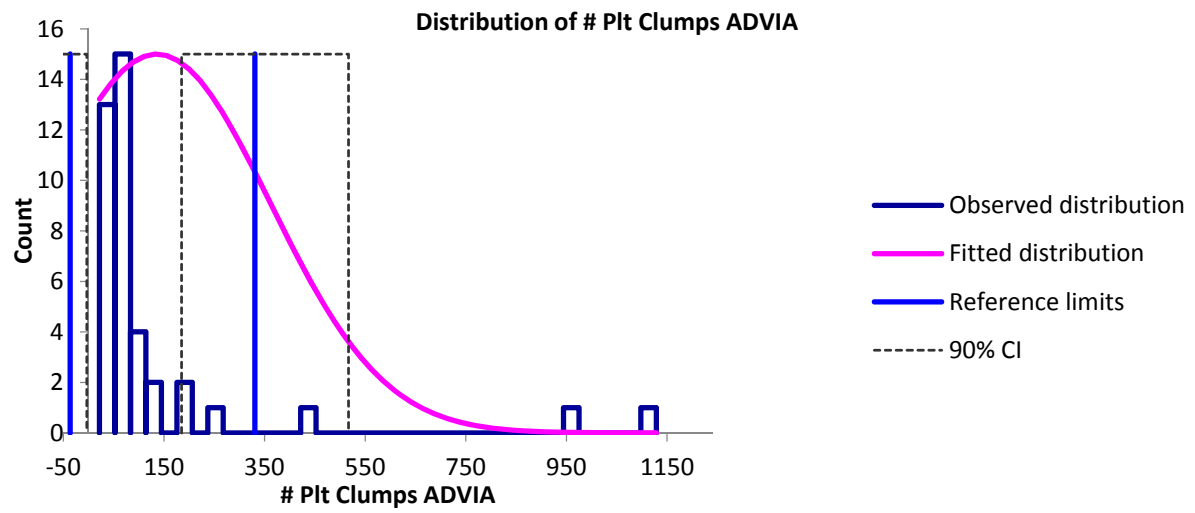
- RBC Fragments ($10^{12}/l$) ADVIA 120/2120



- % Plt Clumps ADVIA 120/2120

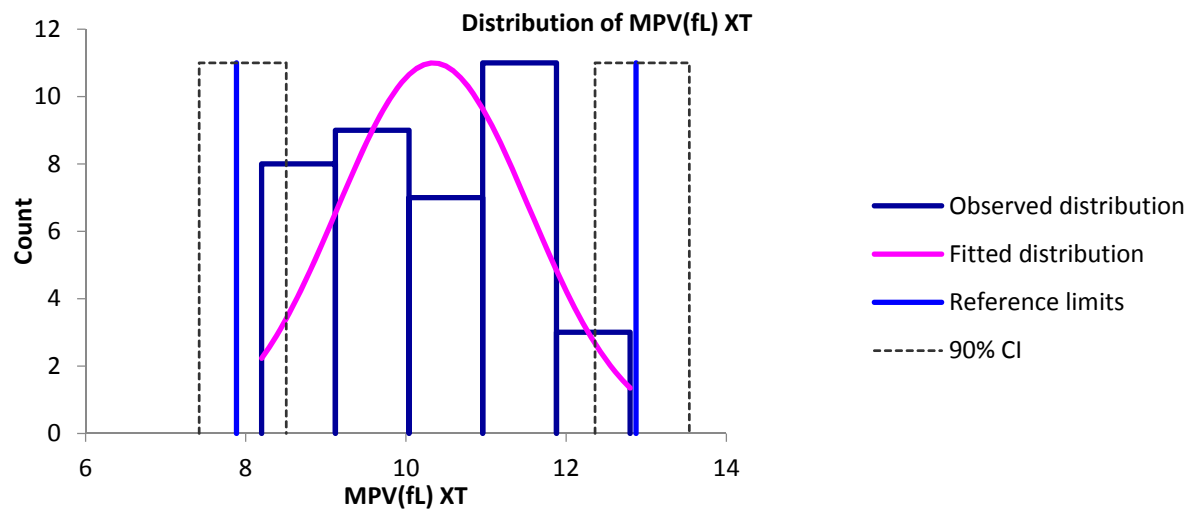


- # Plt Clumps (number events) ADVIA 120/2120

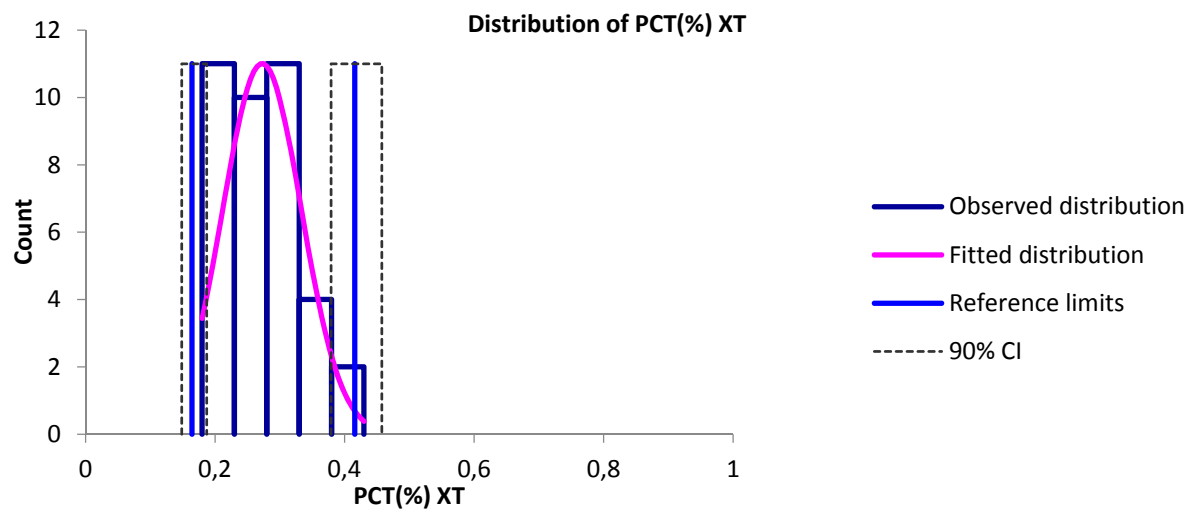


- Hunde verschiedener Rassen (n = 40), Thrombozytenindizes XT-2000iV

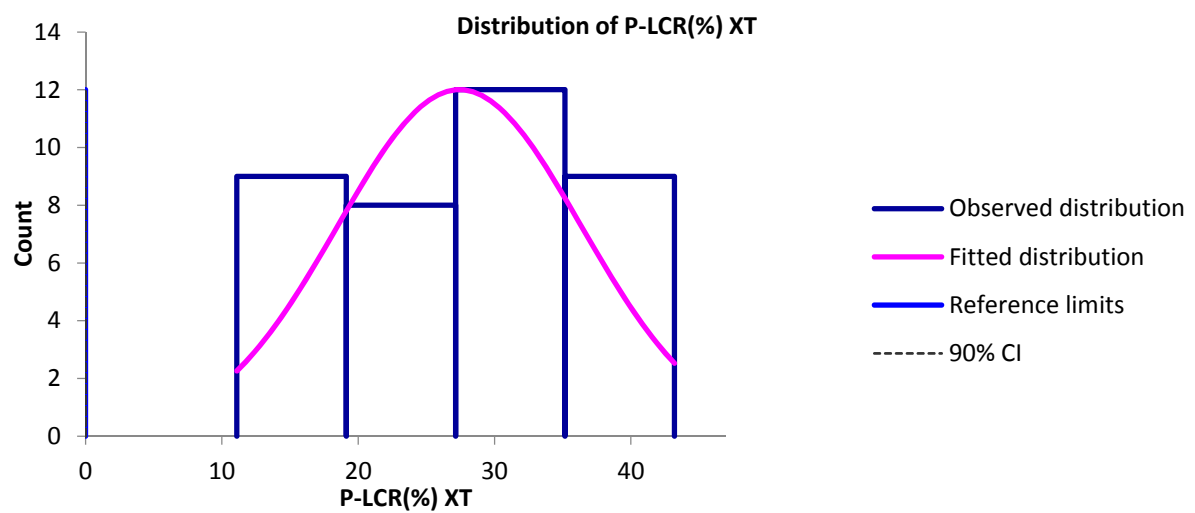
- MPV (fl) XT-2000iV, n=38



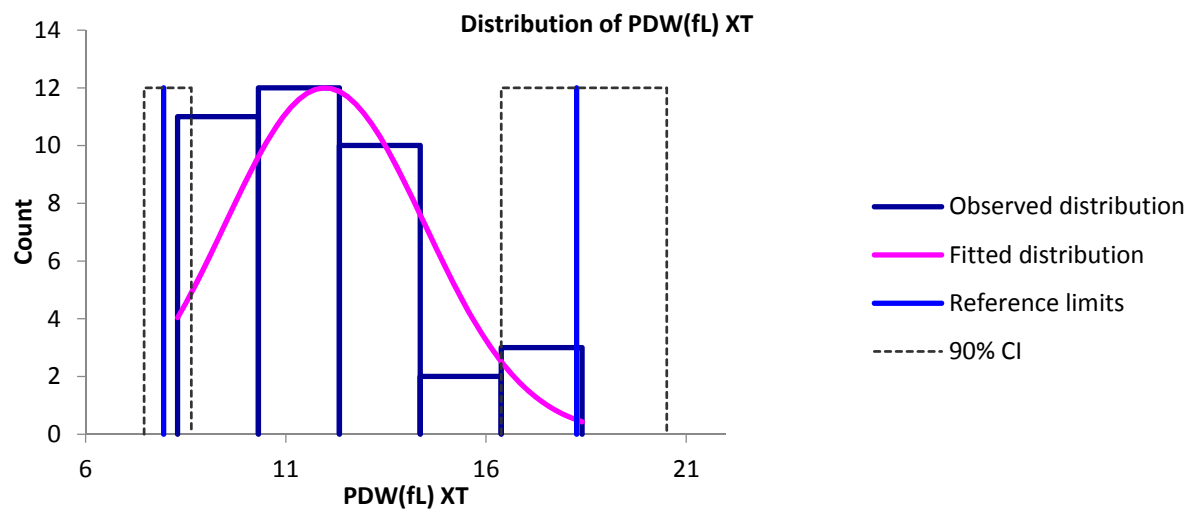
- PCT (%) XT-2000iV, n=38



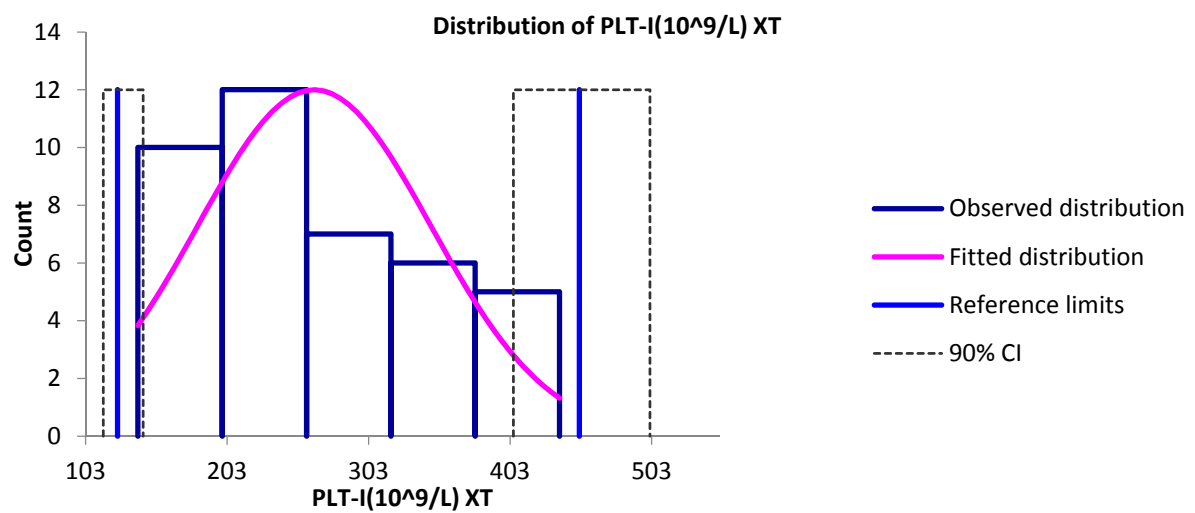
- P-LCR (%) XT-2000iV, n=38



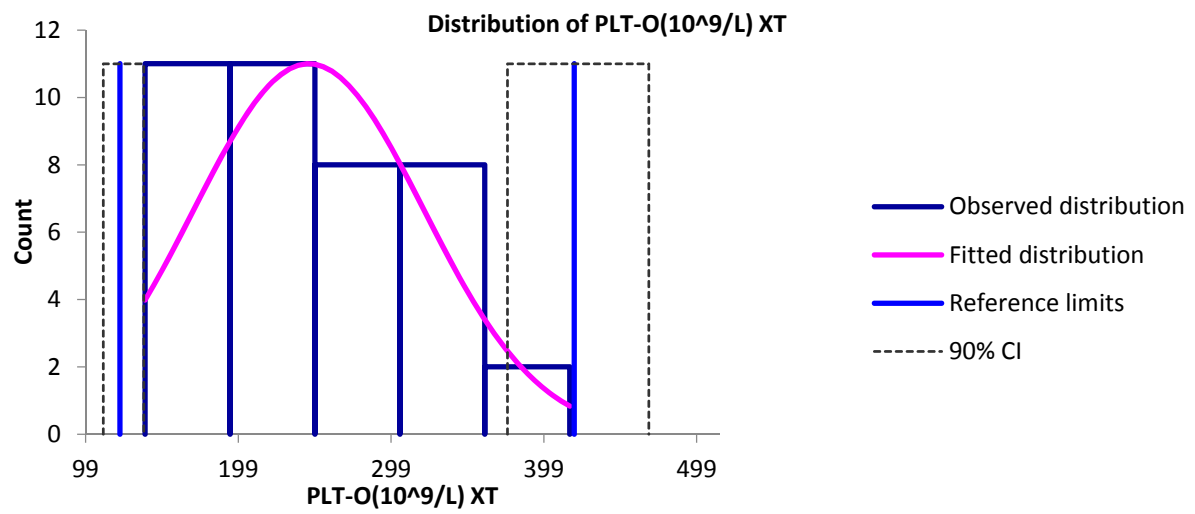
- PDW (fl) XT-2000iV, n=38



- PLT-I ($10^9/l$) XT-2000iV, n=40



- PLT-O ($10^9/l$) XT-2000iV, n=40





édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6294-1



9 78 3 835 19 62 94 1